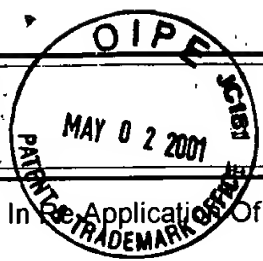


CAU 1635



TRANSMITTAL LETTER
(General - Patent Pending)

Docket No.
CEIAR-044526
RECEIVED

In Re Application Of: Levesque et al.

MAY 04 2001

TECH CENTER 1600/2900
Group Art Unit

Serial No. 09/545,428	Filing Date April 7, 2000	Examiner Schmidt, Mary M.	1635
--------------------------	------------------------------	------------------------------	------

Title:
**Transdifferentiation on Transfected Epidermal Basal Cells into Neural Progenitor Cells,
Neuronal Cells and/or Glial Cells**

#8/
priority

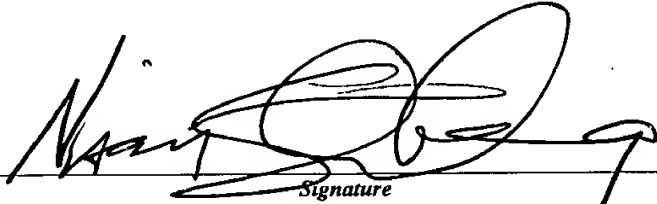
TO THE ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS:

Transmitted herewith is:

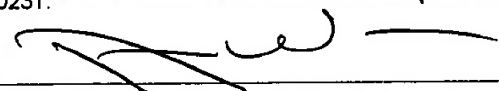
- Certified copies of foreign applications from which priority has been claimed under 35 U.S.C. § 119:
- (1) EP 00101100.6, filed 20/01/2000 and
 - (2) JP 2000-048291, filed 20/01/2000.

in the above identified application.

- ☒ No additional fee is required.
- ☐ A check in the amount of _____ is attached.
- ☐ The Assistant Commissioner is hereby authorized to charge and credit Deposit Account No. _____ as described below. A duplicate copy of this sheet is enclosed.
 - ☐ Charge the amount of _____
 - ☐ Credit any overpayment.
 - ☐ Charge any additional fee required.


Signature
Nisan A. Steinberg, Ph.D.
Registration No. 40,345
SIDLEY & AUSTIN
555 West Fifth Street
Los Angeles, CA 90013-1010
Ofc: 213/896-6665
Fax: 213/896-6600

Dated: April 27, 2001

I certify that this document and fee is being deposited on April 27, 2001 with the U.S. Postal Service as first class mail under 37 C.F.R. 1.8 and is addressed to the Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231.	
 Signature of Person Mailing Correspondence	
Ann Weiss	
Typed or Printed Name of Person Mailing Correspondence	

CC:

発送日 13.4.13

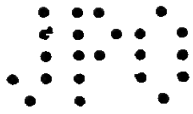


PA-24323



【書類名】	証明請求書
【提出日】	平成13年 3月27日
【あて先】	特許庁長官 殿
【事件の表示】	
【出願番号】	特願2000- 48291
【請求人】	
【識別番号】	100066692
【氏名又は名称】	浅村 皓
【証明に係る事項】	
【証明に係る書類名】	全部

出証特2001-4000023

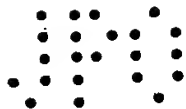


【証明に係る事項】

特2000-048291

証明に係る書類名に記録した事項について相違ないことを証明してください。

出証特2001-4000023



特 2000-048291

【書類名】 特許願

【整理番号】 PA-24323

【特記事項】 特許法第36条の2第1項の規定による特許出願

【提出日】 平成12年 1月20日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

【住所又は居所】 アメリカ合衆国 カリフォルニア、ビーバリー ヒルズ
、エス、キャムデン ドライブ 457

【氏名】 ミシェル エフ、レベスク

【発明者】

【住所又は居所】 アメリカ合衆国 カリフォルニア、サンタ モニカ、ト
ウエンティシックス ストリート 13525、ユニ
ット エイ

【氏名】 トマス ニューマン

【特許出願人】

【住所又は居所】 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ロス アンジェル
ス ベバリー ブールバード 8700番

【氏名又は名称】 セダーシナイ メディカル センター

【代理人】

【識別番号】 100066692

【弁理士】

【氏名又は名称】 浅村 皓

【選任した代理人】

【識別番号】 100072040

【弁理士】

【氏名又は名称】 浅村 肇

【選任した代理人】

【識別番号】 100088926

【弁理士】

【氏名又は名称】 長沼 暉夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100102897

【弁理士】

【氏名又は名称】 池田 幸弘

【パリ条約による優先権等の主張】

【国名】 アメリカ合衆国

【出願日】 1999年 1月20日

【出願番号】 234332

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 002901

【納付金額】 35,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 外国語明細書 1

【物件名】 外国語図面 1

【物件名】 外国語要約書 1

【書類名】 外国語明細書

1 Title of Invention

TRANSDIFFERENTIATION OF TRANSFECTED EPIDERMAL BASAL CELLS
INTO NEURAL PROGENITOR CELLS, NEURONAL CELLS AND/OR GLIAL
CELLS

3 Detailed Description of Invention

BACKGROUND OF THE INVENTION

5 Throughout the application various publications are referenced in parentheses. The disclosures of these publications in their entireties are hereby incorporated by reference in the application in order to more fully describe the state of the art to which this invention pertains.

1. FIELD OF THE INVENTION

10 The present invention is related to the medical arts, particularly to the field of neural tissue regeneration.

2. DISCUSSION OF THE RELATED ART

15 The human nervous system comprises highly diverse cell types that make specific interconnections with one another. The nervous system includes the peripheral nerves and the central nervous system. The central nervous system includes the brain, cranial nerves, and spinal cord. Once damaged, the central nervous system of the adult has limited potential for structural self-repair. The general inability of the adult to generate new neurons (excitable cells specialized for the transmission of electrical signals from one part of the body to another) typically prevents the regeneration of neural tissues. This limitation has hindered the development of therapies for neurological injury, for example from stroke or physical trauma, or for degenerative diseases, such as Huntington disease, Alzheimer disease, and Parkinsonism. The moderate success of fetal tissue transplantation therapy for Parkinsonism suggest that cell replacement therapy can be a valuable treatment for neurological injury and degeneration.

25 Thus, there is a long felt need in the biomedical field for a method of generating neurons for use in the treatment of various neurological traumas, discases, disorders, or maladies via the direct transfer of neuronal cells in a cell replacement therapy approach.

30 A gene therapy approach, on the other hand, is required to treat other types of nervous system disorders. Because the brain is protected by a blood-brain barrier that effectively blocks the flow of large molecules into the brain, peripheral injection of growth factor drugs, or other potentially therapeutic gene products, is ineffective. Thus, a major challenge facing

the biotechnology industry is to find an efficient mechanism for delivering gene therapy products, directly to the brain, so as to treat neurological disorders on the molecular level. In this regard, a renewable source of human neural cells could serve as a vehicle to deliver gene therapy products to the brain and the rest of the central nervous system.

5 Until recently, the only source of donor material for these promising therapies was fetal tissue. However, the use of fetal tissue presents significant ethical and technical problems, including the limited availability of fetal tissue, the possible immuno-rejection of donor material by the recipient, and the risk of disease transmission by donor material.

10 Several attempts have been made to address the shortage of donor material by culturing neural progenitor cells, or neural stem cells. For example, Boss *et. al* taught a method for isolation and proliferation of neural progenitor cells directed to growth, storage, production and implantation of the proliferated donor cells. (Boss *et. al*, *Proliferated Neuron Progenitor Cell Product and Process*, U.S. Patent No. 5,411,883). Anderson *et. al* taught a method for isolation and clonal propagation of donor mammalian neural crest stem cells 15 capable of self renewal and differentiation into neural or glial cells. (Anderson *et. al*, *Mammalian Neural Crest Stem Cells*, U.S. Patent No. 5,589,376). Johe taught a method for isolation, propagation and directed differentiation of stem cells from the central nervous system of embryonic and adult mammalian donors. (Johe, *Isolation Propagation and Directed Differentiation of Stem Cells from Embryonic and Adult Central Nervous System of* 20 *Mammals*, U.S. Patent No. 5,753,506).

Neural progenitor cells normally develop from embryonic ectodermal tissue. Bone Morphogenetic Protein (BMP) is a family of repressors that prevents ectoderm from developing into its default state of neural tissue and induces the development instead of epidermal tissue. (Y. Tanabe & T.M. Jessell, *Diversity and Pattern in the Developing Spinal* 25 *Cord*, Science 274:1115 [1996]; Y. Sasai, *Identifying the missing links: genes that connect neuronal induction and primary neurogenesis in vertebrate embryos*, Neuron 21:455-58 [1998]; Y. Furuta *et al.*, *Bone morphogenetic proteins (BMPs) as regulators of dorsal forebrain development*, Development 124(11):2203-2212 [1997]). BMP 2 and BMP 4 induce epidermal differentiation. (E. Pera *et al.*, *Ectodermal Patterning in the Avian Embryo: Epidermis Versus Neural Plate*, Development 126:63 [1999]). 30

BMP's can also induce cartilage formation. Hattersley *et al.* showed that adding BMP 13 to a cell line derived from mouse limb buds leads to the formation of chondroblast-like cells and taught a method for using BMP 13 to induce articular cartilage formation at the site

of congenital or trauma induced damage and for using BMP 9 to maintain cartilage.
(Hattersley *et al.*, *Cartilage Induction by Bone Morphogenetic Proteins*, U.S. Patent No.
5,902,785).

5 BMP signal transduction appears to be mediated by *msx1*, which is an immediate early
response gene involved in epidermal induction and inhibition of neuronal differentiation.
When Suzuki *et al.* injected BMP RNA into *Xenopus* embryos, they detected *msx1* RNA
production; when they injected *msx1* RNA, the embryos lost neuronal structures such as eyes.
(Suzuki *et al.*, *Xenopus msx1 Mediates Epidermal Induction and Neural Inhibition by BMP4*,
Development 124:3037 [1997]). When *msx1* was added directly to dissociated ectodermal
10 cells, epidermal development was up-regulated and neural development was down-regulated.

Similarly in humans, BMP growth factors induce expression of the homeodomain
transcription factor MSX1 in ectodermal cells. Once MSX1 is expressed, induction of the
neuronal determination genes is simultaneously suppressed and neuronal differentiation is
inhibited.

15 BMP seems to down-regulate neural development through at least two mechanisms:
proteolysis of MASH1 protein and inhibition of Zic3 production. Exposure of neural
progenitor cells to BMP triggered a rapid loss of MASH1 protein, a transcription factor that
is homologous to the *Drosophila* Achaete-Scute Complex (ASH1) and required for the
production of olfactory receptor neurons. (Shou *et al.*, *BMPs Inhibit Neurogenesis by a*
20 *Mechanism Involving Degradation of a Transcription Factor*, Nat. Neurosci. 2: 339 [1999]).
Micro-injection of the dominant negative form of the BMP receptor, an inhibitor of BMP, into
Xenopus embryos induced production of Zic3, a protein that augments neural development.
(Nakata *et al.*, *Xenopus Zic3, a Primary Regulator Both in Neural and Neural Crest*
Development, Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 11980 [1997]).

25 Antagonists of BMP signal transduction activity include fetuin glycoprotein, also
known as α 2-HS glycoprotein in humans, and the DAN family of BMP antagonists, such as
noggin, chordin, follistatin, and gremlin. (R. Merino *et al.*, *The BMP antagonist Gremlin*
regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb,
Development 126(23):5515-22 [1999]; D. Sela-Donnenfeld and C. Kalcheim, *Regulation of*
30 *the onset of neural crest migration by coordinated activity of BMP4 and noggin in the dorsal*
neural tube, Development 126(21):4749-62 [1999]). For example, Demetriou *et al.* showed
that fetuin blocks osteogenesis, a function promoted by BMP, in a culture of rat bone marrow
cells and that a fetuin derived peptide binds BMP 2. (M. Demetriou *et al.*, *Fetuin/ Alpha2-HS*

Glycoprotein is a Transforming Growth Factor-Beta Type II Receptor Mimic and Cytokine Antagonist, J. Biol. Chem. 271:12755-61 [1996]). During embryonic and early postnatal development, Fetuin was shown to be present in a sub-population of cells in the retinal ganglion cell layer, the neuroblastic layer, and portions of the developing cerebellum. (Kitchener *et al.*, *Fetuin in Neurons of the Retina and Cerebellum During Fetal and Postnatal Development of the Rat*, Int. J. Dev. Neurosci. 17: 21 [1999]).

Fetuin has been used as an additive in serum free media. Ham *et al.* taught the use of fetuin as an additive in serum free media for the growth of normal human muscle satellite cells directed at transplantation to the muscles of patients afflicted with muscle degenerative diseases. (Ham *et al.*, *Media for Normal Human Muscle Satellite Cells*, U.S. Patent No. 5,143,842; Ham *et al.*, *Media for Normal Human Muscle Satellite Cells*, U.S. Patent No. 5,324,656). Baker taught the use of fetuin as an additive in a defined serum free media that is capable of growing a wide range of cell suspensions and monolayers. (Baker, *Serum-Free Cell Culture Medium and Process for Making Same*, U.S. Patent No. 4,560,655).

Other factors beside BMP appear to be involved in regulating neural differentiation. Ishibashi *et al.* demonstrated that persistent expression of Hairy and Enhancer of Split Homolog-1 (HES1) severely perturbs neuronal and glial differentiation. They infected the lateral ventricles of the brains of embryonic mice with a retrovirus that produced HES1. This led to failed migration and differentiation in the developing cells that were infected. (Ishibashi *et al.*, *Persistent Expression of Helix-Loop-Helix Factor HES-1 Prevents Mammalian Neural Differentiation in the Central Nervous System*, The EMBO Journal 13: 1799 [1994]). Ishibashi *et al.* also disrupted the HES1 gene in mice and observed earlier than usual neurogenesis. They concluded that HES1 controls the timing of neurogenesis. (Ishibashi *et al.*, *Targeted Disruption of Mammalian Hairy and Enhancer of Split Homolog-1 (HES-1) Leads to Up-Regulation of Neural Helix-Loop-Helix Factors. Premature Neurogenesis, and Severe Neural Tube Defects*, Genes & Development 9: 3136 [1995]). In addition retinoids, such as retinoic acid, may play a role in inducing the differentiation of some neural cell populations. (e.g., Y. Renoncourt *et al.*, *Neurons derived in vitro from ES cells express homeoproteins characteristic of motoneurons and interneurons*, Mechanisms of Development 79:185-97 [1998]).

Thus, the differentiation of neuronal tissue involves the interaction of numerous positive and negative regulatory molecules. In response to developmental signals within each cell and its surrounding microenvironment, every neuronal population expresses a

specific set of neural markers, neurotransmitters, and receptors. As neural progenitor cells differentiate into other neuronal cell types in response to physiological signals in the microenvironment, the set that is expressed will be different. (E.g., see D.L. Stemple and N.K. Mahanthappa, *Neural stem cells are blasting off*, *Neuron* 18:1-4 [1997]; Y. Renoncourt
 5 *et al.*, *Neurons derived in vitro from ES cells express homeoproteins characteristic of motoneurons and interneurons*, *Mechanisms of Development* 79:185-97 [1998]; A.J. Kalyani
et al., *Spinal cord neuronal precursors generate multiple neuronal phenotypes in culture*, *J. Neurosci.* 18(19):7856-68 [1998]). Each neuronal cell type is characterized by several criteria
 10 including morphology (e.g., long processes or neurites), expression of a set of neural-specific markers (e.g., neurofilament M, neural-specific tubulin, neural-specific enolase, microtubule associated protein 2, and others), synthesis of neurotransmitters (e.g., dopamine or expression of tyrosine hydroxylase, the key enzyme in dopamine synthesis), and membrane excitability.

One of the central principles of modern neurobiology is that after differentiation each
 15 of the major projection neurons, if not all neuronal cell types, requires for its survival specific cytokines, i.e., neurotrophic or nerve growth factors, to reach their target neuronal cells. Neuropathies in many diseases may be caused by, or involve lack of, such nerve growth factors. These nerve growth factors represent the next generation of preventative and therapeutic drugs for nervous system disorders. Most of the growth factors known so far in
 20 the nervous system were discovered by their effects on peripheral nerves and these most likely represent a very minor fraction of existing growth factors in the brain. Search for growth factors from the brain has been difficult mainly because particular neuronal cell types are difficult to isolate from the brain and maintain in defined culture conditions.

Due to this limitation, drug discovery by traditional pharmacology directed to the
 25 central nervous system has been performed using whole brain homogenate and animals. These studies mostly produced analogs of neurotransmitters with broad actions and side effects. But as more and more neurotransmitter receptors and signal transducing proteins have been identified from the brain, it is becoming clear that the dogma of one neurotransmitter activating one receptor is an over-simplification. Most receptor complexes in neurons are
 30 composed of protein subunits encoded by several genes and each gene synthesizes many different variations of the protein. These variations result in a wide range of possible receptor combinations, and not a single receptor that can interact with a neurotransmitter. Consequently, a range of signal output may be produced by a single neurotransmitter action.

The specific signal effected by a neurotransmitter on a neuron, then, depends on which receptor complex is produced by the cell. Thus, cellular diversity must parallel the molecular diversity and constitute a major structural element underlying the complexity of brain function, and a source of diverse neuronal cell types that can be cultured for drug screening purposes is needed.

Therefore, there remains a need in the field of neurological research and applied neurobiology for a renewable non-fetal source of neural progenitor cells and cells having characteristics specifically associated with neuronal or glial cell types, for use in research, cell therapy, or gene therapy. Importantly, the use of such cells could eliminate a need for fetal human tissue in therapeutic approaches aimed at restoring neurological function by intracerebral transplantation of nervous system cells. These and other benefits the present invention provides as described herein.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to a method of transdifferentiating an epidermal basal cell into a cell having one or more morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural progenitor cell, a neuronal cell, or a glial cell. The method involves culturing a proliferating epidermal basal cell population comprising one or more epidermal basal cell(s) derived from the skin of a mammalian subject. These epidermal basal cell(s) are transfected, in vitro, with one or more eukaryotic expression vector(s) that contain at least one cDNA encoding a human neurogenic transcription factor, or homologous non-human counterpart, or active fragment(s) thereof, such as NeuroD1, NeuroD2, ASH1, Zic1, Zic3, or MyT1, such that at least one of the neurogenic transcription factor(s) is expressed in the cell. The transfected cell(s) are grown in an in vitro growth medium in which is present at least one antisense oligonucleotide comprising a segment of a human MSX1 gene and/or human HES1 gene, or homologous non-human counterpart of either of these, thereby suppressing at least one negative regulator of neuronal differentiation; and the cell(s) are, optionally, further grown with a retinoid and at least one neurotrophin, such as BDNF, CNTF, PDGF, NGF, NT-3, NT-4, or sonic hedgehog, or a cytokine comprising IL-6. By the inventive method the cell(s) is transdifferentiated into a cell having one or more morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural progenitor, neuronal, or glial cell.

The present invention also relates to a transdifferentiated cell(s) of epidermal origin. The inventive transdifferentiated cell is a cell of epidermal basal cell origin that displays one

or more morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural progenitor, neuronal, or glial cell. The physiological and/or immunological feature can be, but is not limited to, expression of one or more marker(s) specific to a neural progenitor, neuronal, or glial cell, by which the transdifferentiated cell is recognized as a neural progenitor, neuronal or neuron-like cell, or a glial or glial-like cell.

The present invention also relates to cell cultures derived from the inventive transdifferentiated cell(s).

The present invention is also directed to a method of delivering locally secretable regulatory factors using the inventive transdifferentiated cells, which are genetically modified, before or after their transdifferentiation, with an expression vector comprising a DNA encoding a preselected secretable regulatory factor or a biochemical precursor thereof, or a DNA encoding an enzyme that catalyzes the synthesis of either of these. The genetically modified, transdifferentiated cells are implanted into a mammalian subject, and the implanted cells secrete the locally secretable regulatory factor.

The present invention also relates to method of using the inventive transdifferentiated cell(s) to identify a novel nerve growth factor or potential chemotherapeutic agent. The methods involve transdifferentiating a population of proliferating epidermal basal cells into neuronal progenitor cells, neuronal cells, or glial cells; culturing the transdifferentiated cells; exposing the cultured cells, in vitro, to a potential nerve growth factor (i.e., neurotrophin or neurotrophic factor) and/or potential chemotherapeutic agent; and detecting the presence or absence of an effect of the potential nerve growth factor and/or potential chemotherapeutic agent on the survival of the cells or on a morphological or electrophysiological characteristic and/or molecular biological property of the cells. The presence of an effect altering cell survival, a morphological or electrophysiological characteristic and/or a molecular biological property of the cells indicates the activity of the potential nerve growth factor and/or potential chemotherapeutic agent.

The present invention also relates to a method of using the inventive transdifferentiated cell(s) to screen a potential chemotherapeutic agent to treat a nervous system disorder of genetic origin. In the method the epidermal basal cells are derived from a human subject having a particular nervous system disorder of genetic origin. The cells are transdifferentiated in accordance with the inventive method. The transdifferentiated cells are cultured and exposed, in vitro, to a potential chemotherapeutic agent. The method involves detecting the presence or absence of an effect of the potential chemotherapeutic agent on the survival of the

cells or on a morphological or electrophysiological characteristic and/or molecular biological property of said cells. An effect altering cell survival, a morphological or electrophysiological characteristic and/or a molecular biological property of the cells indicates the activity of the chemotherapeutic agent.

5 The present invention is also related to a kit for transdifferentiating an epidermal basal cell into a cell having one or more morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural progenitor, neuronal, or glial cell. The kit is useful for practicing the inventive methods.

10 The present invention is directed to methods of converting, or transdifferentiating, epidermal cells into different types of neural cells having numerous uses in the field of applied neurobiology. In particular, the newly created neurons of the invention can be used in both cell therapies and gene therapies aimed at alleviating neurological disorders and diseases. Further, the invention obviates the need for human fetal tissue as a renewable source of neurons to be used in various medical and research applications.

15 These and other advantages and features of the present invention will be described more fully in a detailed description of the preferred embodiments which follows.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

20 Figure 1. Transdifferentiation of epidermal basal cells into neuronal cells. Dedifferentiated epidermal basal cells were transfected with NeuroD1+Zic1+MyT1 and simultaneously treated with antisense oligonucleotides corresponding to a portion of MSX1 and HES transcription factors. (A) epidermal basal cells, (B) dedifferentiated epidermal basal cells, (C) newly created neurons, 25% of cells are Neurofilament M immunoreactive 5 days after transfection and treatment with BDNF and all-trans retinoic acid.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS OF THE INVENTION

25 An awareness of the difficulties currently associated with neuronal cell or gene therapy approaches, as these pertain to the use of alternative sources of neuronal cells, especially those used for autologous transplantation, has led to the present invention. The present invention provides methods to convert, or transdifferentiate, epidermal cells into different types of neuronal cells that can be used for intracerebral transplantation. Importantly, the present

30

invention also allows for genetic manipulation of the newly created neurons.

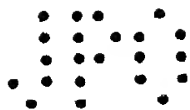
A significant aspect of the present invention is that it permits the use of a patient's own cells to develop different types of neuronal cells that can be transplanted after *in vitro* growth and transdifferentiation. Thus, this technology eliminates the problems associated with transplantation of non-host cells, such as, immunological rejection and the risk of transmitting disease.

The present invention can be used to generate neurons from an individual patient, thus making autologous transplantations possible as a treatment modality for many neurological conditions including neurotrauma, stroke, neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease, Huntington disease, Alzheimer's diseases. Thus, the invention provides for neurological therapies to treat the disease or trauma of interest.

To summarize, this technology provides a plentiful source of neurons for clinical treatments which require transplantation of neurons 1) to compensate for a loss of host neurons, or 2) as vehicles to deliver genetically-based drugs. Further, the invention provides a novel neurological tool for use in basic research and drug screening.

The theoretical molecular basis of the present invention exploits the orchestrated actions in neuronal development of numerous molecular processes including epigenetic signaling and activation of specific transcription factor systems. During development, ectodermal cells develop into neuronal tissue or epidermis, depending on the signals they receive from the surrounding cells. At this early developmental stage, activation of various members of the bone morphogenetic protein family (BMP) of growth factors results in epidermal differentiation, while blocking their action results in neuronal differentiation. (See Tanabe and Jessel, 1996, for a review.) This differentiation pathway is due to the action of BMP growth factors which induce expression of the homeodomain transcription factor MSX1 in ectodermal cells. Once MSX1 is expressed, induction of the neuronal determination genes is simultaneously suppressed and neuronal differentiation is inhibited. (Suzuki et al., 1997).

Alternatively, retinoic acid and Sonic Hedgehog (Shh) signaling are responsible for the induction of expression of several neuronal determination and differentiation genes whose activity is essential for neuronal differentiation. (See Tanabe and Jessel, 1996, for a review.) In particular, data demonstrate that over-expression of several neurogenic basic Helix-Loop-Helix (bHLH) and Zinc-finger transcription factors results in conversion of non-determined ectoderm into neuronal tissue. Additionally, forced expression of bHLH transcription factors, NeuroD1, NeuroD2 (Lee, J.E., Hollenberg, S.M., Snider, L., Turner,



D.L., Lipnick, N. and Weintraub, H. (1995). Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by neuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 268, 836-844; McCormick, M.B., Tamimi, R.M., Snider, L., Asakura, A., Bergstrom, D. and Tapscott, S.J. (1996). NeuroD2 and NeuroD3: distinct expression patterns and transcriptional activation potentials within the neuroD gene family. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5792-5800), or neurogenin 1 (Ma, Q., Kintner, C. and Anderson, D.J. (1996). Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* 87, 43-52; McCormick et al., 1996), or Zinc-finger transcription factors MyT1 (Bellefroid, E.J., Bourguignon, C., Hollemann, T., Ma, Q., Anderson, D.J., Kintner, C. and Pieler, T. 1996. X-MyT1, a *Xenopus* C2HC-type zinc finger protein with a regulatory function in neuronal differentiation. *Cell* 87, 1191-1202.) or Zic3 (Nakata et al., 1997) results in induction of additional neurogenic transcription factors and initiation of neuronal differentiation of amphibian ectodermal cells.

Moreover, at the level of gene regulation, the effect of neurogenic bHLH transcription factors is antagonized by the HES family of transcription factors which are known to suppress transcription. Over-expression of HES1 protein in developing neuronal cells blocks neuronal differentiation (Ishibashi et al., 1994), whereas blocking its expression stimulates neuronal differentiation (Ishibashi et al., 1995). Thus, neuronal differentiation, like other biological process, is regulated by both positive and negative factors.

The molecular regulatory mechanisms known to be operational during amphibian development were used as the theoretical basis for the present invention. The methods and cell products of the invention are based on the discovery that induced expression of a transcription factor that positively regulates human neuronal differentiation, performed in concert with the suppression of a negative regulator of human neuronal differentiation, results in the conversion of epidermal cells into newly created neurons.

The inventive method, which exploits these molecular mechanisms, results in epidermal basal cells being transdifferentiated into cells having one or more morphological, physiological and/or immunological features of a neural progenitor, neuronal or glial cell. Morphological features include, for example, neurite-like process(es) at least about 50 micrometers in length, characteristic of neuronal cells. Physiological and/or immunological features include expression of one or more specific markers and/or characteristic physiological responses to neural growth factors and other cytokines. Electrochemical characteristics of the cells, or particularly the cell membranes, are also included among physiological features, as are production and secretion by the transdifferentiated cells of regulatory factors such as

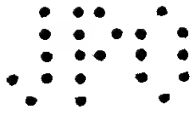
dopamine or γ -aminobutyric acid (GABA), characteristic of various neuronal cell types.

In accordance with the inventive method, a proliferating epidermal basal cell population is cultured. Thus, the method of transdifferentiating or converting epidermal basal cells into newly created neural progenitors, neurons, and glial cells begins with obtaining epidermal cells from a mammalian subject's (e.g., a human patient's) skin. The cells of the proliferating epidermal basal cell population are derived from any mammalian subject, including a human subject. The cell(s) can be derived directly from a tissue sample resulting from a surgical procedure such as a skin biopsy of the subject, or can be derived indirectly from cultured or stored epidermal basal cells of the subject.

Epidermal basal cells in a skin tissue sample or in a cultured mixed population of basal and keratinized non-basal epidermal cells, are preferably separated from the terminally differentiated keratinized epidermal cells by exposing the mixed cell population to a calcium-free growth medium. For purposes of the present invention, a calcium-free medium contains less than 10^{-6} M calcium cations (Ca^{2+}). Low calcium cation concentration results in the stripping of the keratin-forming upper epidermal layers from the basal cells. (E.g., P.K. Jensen and L. Bolund, *Low Ca^{2+} stripping of differentiating cell layers in human epidermal cultures: an invitro model of epidermal regeneration*, Experimental Cell Research 175:63-73 [1988]). The basal cells are then physically separated, selected or isolated from the keratinized cells by any convenient method, such as aspiration or decantation. Calcium cations are required to support development of keratinocytes (skin cells) from basal cells, and returning calcium to the growth medium results in rapid basal cell proliferation in the dedifferentiated cell population (Jensen and Bolund [1988]), and, thus, a proliferating epidermal basal cell population is cultured. Beyond this, it is not necessary to do a dedifferentiating step with respect to individual epidermal basal cell(s) after they are separated, isolated, or selected from the differentiated keratinized cells.

In proliferating cell types other than epidermal basal cell, however, calcium may not be necessary to support development of any particular developmental pathway that is being deregulated. Other means to achieve the desired end of dedifferentiation involve treating the cells with specific growth factor or cytokines. Also, altering the specific gene expression pathway that is responsible for differentiation of epidermal cells by genetic manipulation may be used instead of eliminating calcium in the growth media. Moreover, elimination of calcium may not be required if other than proliferating epidermal basal cells are used.

Transfecting or otherwise genetically modifying the epidermal basal cells is then done



in vitro with one or more expression vector(s) containing at least one cDNA encoding a neurogenic transcription factor responsible for neural differentiation. Suitable cDNAs include the basic-helix-loop-helix activators, such as NeuroD1, NeuroD2, ASH1, and zinc-finger type activators, such as Zic3, and MyT1, or other cDNAs including bHLH and/or Zn-finger neurogenic genes. The transcription factors are preferably of human origin, but homologous, non-human counterparts can also be utilized in the invention. Sequences of such non-human counterparts of NeuroD1, NeuroD2, ASH1, Zic1, Zic3, and MyT1 are available from, for example, the GenBank database of NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The neurogenic transcription factor gene(s) is operatively linked to a promoter of the expression vector, i.e., a transcriptional unit is formed from which the gene is transcribed, producing mRNA from which gene product is translated in the cell after gene delivery. Therefore, in accordance with the inventive method, expression of the neurogenic transcription factor(s) is preferably controlled by a constitutively expressed eukaryotic promoter, such as a cytomegalovirus (CMV) promoter.

Gene delivery to the cell is by any suitable in vitro gene delivery method. (E.g., D.T. Curiel *et al.*, U.S. Patent Nos. 5,521,291 and 5,547,932). Typically, gene delivery involves exposing a cell to a gene delivery mixture that includes preselected genetic material together with an appropriate vector, mixed, for example, with an effective amount of lipid transfecting agent (lipofection). The amount of each component of the mixture is chosen so that gene delivery to a specific species of cell is optimized. Such optimization requires no more than routine experimentation. The ratio of DNA to lipid is broad, preferably about 1:1, although other proportions may also be utilized depending on the type of lipid agent and the DNA utilized. This proportion is not crucial. Other well known gene delivery methods include electroporation or chemical methods. (E.g., M. Ostresh, *No barriers to entry: transfection tools get biomolecules in the door*, The Scientist 13(11):21-23 [1999]).

"Gene delivery agent", as used herein, means a composition of matter added to the genetic material for enhancing the uptake of exogenous DNA segment(s) into a mammalian cell. The enhancement is measured relative to the uptake in the absence of the gene delivery agent. Examples of gene delivery agents include adenovirus-transferrin-polylysine-DNA complexes. These complexes generally augment the uptake of DNA into the cell and reduce its breakdown during its passage through the cytoplasm to the nucleus of the cell.

An immunoliposome transfection method is a preferred means of gene delivery. Other preferred methods also yield high transfection efficiency, such as Ca-coprecipitation, or

transfection using gene delivery agents such as Lipofectamine (Life Technologies), or Fugene-6 (Boehringer Mannheim, Inc.). Other preferred gene delivery agents include Lipofectin[®], DMRIE C, Cellfectin[®] (Life Technologies), LipoTAXI (Stratagene), Superfect or Effectene (Qiagen). Although these are not as efficient gene delivery agents as viral agents, they have the advantage that they facilitate stable integration of xenogeneic DNA sequence into the vertebrate genome, without size restrictions commonly associated with virus-derived gene delivery agents. But a virus, or transfecting fragment thereof, can be used to facilitate the delivery of the genetic material into the cell. Examples of suitable viruses include adenoviruses, adeno-associated viruses, retroviruses such as human immune-deficiency virus, other lentiviruses, such as Moloney murine leukemia virus and the retrovirus vector derived from Moloney virus called vesicular-stomatitis-virus-glycoprotein (VSV-G)-Moloney murine leukemia virus, mumps virus, and transfecting fragments of any of these viruses, and other viral DNA segments that facilitate the uptake of the desired DNA segment by, and release into, the cytoplasm of cells and mixtures thereof. All of the above viruses may require modification to render them non-pathogenic or less antigenic. Other known viral vector systems are also useful.

The transfection step is followed by expressing, or over-expressing, at least one of the neurogenic transcription factors, while simultaneously, or near simultaneously, deactivating factors that are responsible for suppressing neuronal differentiation. This latter step is accomplished by adding to the growth medium at least one antisense oligonucleotide known to suppress neuronal differentiation, such as the human MSX1 gene and/or the human HES1 gene (or non-human, homologous counterparts), and growing the cells.

Thus, the transfected epidermal basal cell(s) are grown in the presence of at least one antisense oligonucleotide comprising a nucleotide sequence of a segment of a human MSX1 gene and/or a nucleotide sequence of a segment of a human HES1 gene, or homologous non-human counterpart of either of these, in an amount sufficient to suppress the expression of functional gene product of MSX1 or HES1. A sufficient amount of antisense oligonucleotides directed to suppressing transcription of both MSX1 and HES1 is a concentration in the medium of about 5 to 10 μ M each. Examples of useful antisense oligonucleotide sequences include the following human MSX1 antisense oligonucleotide sequences:

5'-GACACCGAGTGGCAAAGAAGTCATGTC-3' (first methionine) (MSX1-1; SEQ. ID. NO.:13) or

5'-CGGCTTCCTGTGGTCGGCCATGAG-3' (third methionine) (MSX1-2; SEQ. ID. NO.:14); and two antisense oligonucleotides corresponding to the human HES1 open reading frame 5' sequence:

5'-ACCGGGGACGAGGAATTTTCTCCATTATATCAGC-3' (HES1-1; SEQ.ID.NO.:15)

5 or HES1 open reading frame middle sequence 2:

5'-CACGGAGGTGCCGCTGTTGCTGGGCTGGTGTGGTGTAGAC-3' (HES1-2; SEQ. ID. NO.:16).

Other oligonucleotide sequences are also useful as long as they will hybridize to nucleic acids comprising at least a segment of a human or homologous non-human MSX1 gene (e.g., GenBank Accession Nos. M97676 [human]; NM 002448 [human]; X62097 [chicken]; D82577.1 [*Ambystoma mexicanum*]) or at least a segment of an HES1 gene (e.g., GenBank Accession Nos. Y07572 [human]; Q04666 [rat]; P35428 [mouse]; AB019516 [newt]; AB016222 [*Saccharomyces pombe*]; U03914 [*Saccharomyces cerevisiae*]), preventing expression of functional MSX1 and/or HES1 gene products by targeting (i.e., hybridizing with) MSX1 or HES1 nucleic acids. The skilled artisan can readily find other useful MSX1 and /or HES1 oligonucleotide sequences by conducting a sequence similarity search of a genomics data base, such as the GenBank database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), using a computerized algorithm, such as PowerBLAST, QBLAST, PSI-BLAST, PHI-BLAST, gapped or ungapped BLAST, or the "Align" program through the Baylor College of Medicine server. (E.g., Altschul, S.F., *et al.*, *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*, Nucleic Acids Res. 25(17):3389-402 [1997]; Zhang, J., & Madden, T.L., *PowerBLAST: a new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation*, Genome Res. 7(6):649-56 [1997]; Madden, T.L., *et al.*, *Applications of network BLAST server*, Methods Enzymol. 266:131-41 [1996]; Altschul, S.F., *et al.*, *Basic local alignment search tool*, J. Mol. Biol. 215(3):403-10 [1990]).

Preferably, one or more nucleotide residues of the antisense oligonucleotides is thio-modified by known synthetic methods, used by the practitioner or by a commercial or other supplier, to increase the stability of the oligonucleotides in the culture media and in the cells. (E.g., L. Bellon *et al.*, *4'-Thio-oligo-beta-D-ribonucleotides: synthesis of beta-4'-thio-oligouridylates, nuclease resistance, base pairing properties, and interaction with HIV-1 reverse transcriptase*, Nucleic Acids Res. 21(7):1587-93 [1993]; C. Leydier *et al.*, *4'-Thio-RNA: synthesis of mixed base 4'-thio-oligoribonucleotides, nuclease resistance, and base pairing properties with complementary single and double strand*, Antisense Res. Dev.

5(3):167-74 [1995]).

During the growing of the transfected cells, exposure to the antisense oligonucleotides is for a period long enough for MSX1 and/or HES1 proteins pre-existing in the growing cells to be degraded. For particular proteins with a relatively short half-life, the exposure period necessary is only a matter of hours to one day. Proteins with relatively long half-life require longer treatments with antisense oligonucleotides. An exposure period of about two to three days generally suffices. The further course of development of the transdifferentiated cells depends on the in situ environmental cues to which they are exposed, whether in vitro, or implanted in vivo. Optionally, the transdifferentiated cell(s) are grown in a medium including a retinoid compound, such as retinoic acid or Vitamin A, and optionally a nerve growth factor or neurotrophin, such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF), ciliary neurotrophic factor (CNTF), platelet-derived growth factor (PDGF), nerve growth factor (NGF), neurotrophin (NT)-3, neurotrophin (NT)-4, or sonic hedgehog (Shh), and/or functional fragments of any of these. For example, treating newly formed neuronal cells with all-trans retinoic acid and BDNF results in development of GABAergic neurons or neuron-like cells (that express Neurofilament M), whereas treatment with glial-conditioned media and sonic hedgehog aminoterminal peptide (Shh-N) results in development of mostly dopaminergic neuronal cells. Treatment with Shh-N promotes the differentiation of neuronal and oligodendroglial species from nestin-immunoreactive cells (uncommitted neural progenitor cells) and inhibits the antiproliferative, astroglial-inductive, oligodendroglial-suppressive effects of BMP2. (E.g., G. Zhu *et al.*, *Sonic hedgehog and BMP2 exert opposing actions on proliferation and differentiation of embryonic neural progenitor cells*, *Dev. Biol.* 215(1):118-29 [1999]). This plasticity in response to the environmental cues allows the cells to maintain neuronal differentiation in vitro or in situ, when implanted into the mammalian subject, without the further addition of antisense oligonucleotides.

In accordance with the method, expression of any neural progenitor-specific, neural-specific, and/or glial specific marker is detected by conventional biochemical or immunochemical means. Preferably, immunochemical means are employed, such as, but not limited to, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunofluorescent assay (IFA), immunoelectrophoresis, immunochromatographic assay or immunohistochemical staining.

These methods employ marker-specific polyclonal or monoclonal antibodies or antibody fragments, for example Fab, Fab', F(ab')₂, or F(v) fragments, that selectively bind any of various neural progenitor, neuronal or glial cell antigens. Antibodies targeting individual

specific markers are commercially available and are conveniently used as recommended by the antibody manufacturers. Markers specific to neural progenitor, neuronal, or glial cells include antigenic molecules that indicate expression of, for example, nestin, neural RNA-binding protein Musashi, neurofilament M (NF-M; Sigma, Inc.), neural-specific tubulin (Sigma, Inc.), neural-specific enolase (Incstar, Inc.), microtubule associated protein 2 (MAP2, Boehringer Mannheim), glial fibrillary acidic protein, O4, or any other detectable marker specific to a neural progenitor, neuronal or glial cell.

Alternatively, expression of neural progenitor-specific, neural-specific or glial-specific markers is detected by conventional molecular biological techniques for amplifying and analyzing mRNA transcripts encoding any of the markers, such as but not limited to reverse transcriptase-mediated polymerase chain reaction (RT-PCR), transcription-mediated amplification (TMA), reverse transcriptase-mediated ligase chain reaction (RT-LCR), or hybridization analysis. Nucleic acid sequences encoding markers (e.g., nestin, neural RNA-binding protein Musashi, neurofilament M, neural-specific tubulin, neural-specific enolase, microtubule associated protein 2, glial fibrillary acidic protein, O4) specific to neural progenitor, neuronal or glial cells are known and available in databases such as GenBank. The skilled artisan can readily determine other useful marker-specific sequences for use as primers or probes by conducting a sequence similarity search of a genomics data base, such as the GenBank database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), using a computerized algorithm, such as PowerBLAST, QBLAST, PSI-BLAST, PHI-BLAST, gapped or ungapped BLAST, or the "Align" program through the Baylor College of Medicine server. (E.g., Altchul, S.F., *et al.*, *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*, Nucleic Acids Res. 25(17):3389-402 [1997]; Zhang, J., & Madden, T.L., *PowerBLAST: a new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation*, Genome Res. 7(6):649-56 [1997]; Madden, T.L., *et al.*, *Applications of network BLAST server*, Methods Enzymol. 266:131-41 [1996]; Altschul, S.F., *et al.*, *Basic local alignment search tool*, J. Mol. Biol. 215(3):403-10 [1990]).

Optionally, morphological criteria are additionally used to detect transdifferentiation of epidermal basal cells into neurons or neuron-like cells. For example, neurons or neuron-like cells may express neurites, or neurite-like processes, longer than three cell diameters (about 50 microns or longer).

The present invention also relates to a transdifferentiated cell of epidermal origin having a morphological, physiological and/or immunological feature of a neural progenitor, neuronal,

or glial cell. The inventive cell can be, but is not necessarily, produced by the inventive method of transdifferentiating an epidermal basal cell into a cell having one or more morphological, physiological and/or immunological features of a neural progenitor, neuronal, or glial cell (astrocyte, oligodendrocyte, or microglia). The cell includes cultured cellular progeny of a cell transdifferentiated from an epidermal basal cell.

“Neural progenitor” is an ectodermally-derived pluripotent stem cell having, as a physiological feature, a capacity, under physiological conditions that favor differentiation (e.g., presence of particular neurotrophic factors), to develop one or more morphological, physiological and/or immunological features specifically associated with a neuronal or glial cell type, i.e., neurons, astrocytes (i.e., astroglia), oligodendrocytes (i.e., oligodendroglia), and microglia. For example, bipotent neural progenitor cells differentiate into astrocytes after exposure to ciliary neurotrophic factor (CNTF), or into neuronal cells after exposure to platelet-derived growth factor (PDGF). (E.g., J.K. Park *et al.*, *Bipotent cortical progenitor cells process conflicting cues for neurons and glia in a hierarchical manner*, J. Neurosci. 19(23):10383-89 [1999]). Some neural progenitors are “neural restricted” progenitors, which can differentiate only into neurons.

The presence of neural progenitors can be detected by functional testing under suitable physiological conditions to determine the course of development and differentiation into neuronal or glial cells. Preferably, neural progenitor cells are identified by detecting the expression of any of several well-defined specific markers, such as the cytoskeletal protein nestin and/or neural RNA-binding protein Musashi (MSI). (E.g., T. Nagata *et al.*, *Structure, backbone dynamics and interactions with RNA of the C-terminal RNA-binding domain of a mouse neural RNA-binding protein, Musashi1*, J. Mol. Biol. 287(2):315-30 [1999]; P. Good *et al.*, *The human Musashi homolog 1 (MSI1) gene encoding the homologue of Musashi/Nrp-1, a neural RNA-binding protein putatively expressed in CNS stem cells and neural progenitor cells*, Genomics 52(3):382-84 [1998]; S. Sakakibara *et al.*, *Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell*, Dev. Biol. 176(2):230-42 [1996]).

“Neuronal” cells, or “neuron-like” cells, include cells that display one or more neural-specific morphological, physiological and/or immunological features associated with a neuronal cell type, including sensory neuronal, motoneuronal, or interneuronal cell types. The practitioner can choose, in connection with a particular application, the operative criteria or subset of specific features used for determining whether a transdifferentiated cell belongs to

a particular type of neuronal population. Useful criterial features include morphological features (e.g., long processes or neurites); physiological and/or immunological features, such as expression of a set of neural-specific markers or antigens (e.g., neurofilament M, neural-specific β -tubulin, neural-specific enolase, microtubule associated protein 2, or others);
 5 synthesis of neurotransmitter(s) (e.g., dopamine; expression of tyrosine hydroxylase-- the key enzyme in dopamine synthesis; or gamma aminobutyric acid [GABA]); the presence of receptors for neurotransmitter(s); and/or physiological features such as membrane excitability and/or developmental response to particular cytokines or growth factors. An advantage of the transdifferentiated cell(s) of the invention is that it can be manipulated, in vitro in the
 10 presence of specific exogenously supplied signal molecules, or in vivo within specific microenvironments, into diverse neuronal types as defined by the practitioner's operative criteria.

A glial cell or "glial-like" cell includes a cell that has one or more glial-specific features, associated with a glial cell type, including a morphological, physiological and/or
 15 immunological feature specific to a glial cell (e.g. astrocytes or oligodendrocytes), for example, expression of the astroglial marker fibrillary acidic protein (GFAP) or the oligodendroglial marker O4.

In one embodiment, the transdifferentiated cell exhibits a lack of mitotic activity under cell culture conditions which induce differentiation in neural progenitor cells, such as nutrient-
 20 rich medium containing neurotrophins (e.g., DMEM/F12, plus neuronal growth supplement B27 [Gibco-BRL], 10^{-7} M all-trans retinoic acid and brain derived neurotrophic factor [BDNF; 20 ng/mL], at 37°C in an atmosphere containing 5% CO_2).

In other embodiments, the cell is a GABAergic cell, i.e., a cell that produces gamma aminobutyric acid, the predominant inhibitory neurotransmitter in the central nervous system.
 25 For example, treating the transdifferentiated cells plated on laminin coated surface with all-trans retinoic acid (10^{-7} M) and BDNF (10 ng/mL) for 5-15 days results in development of GABAergic neurons or neuron-like cells.

In still other embodiments, the transdifferentiated cell is a dopaminergic cell, i.e., a cell that produces dopamine, a catecholamine neurotransmitter and hormone. These cells
 30 result from post-transdifferentiation treatment with glial conditioned media and sonic hedgehog aminoterminal peptide.

In one embodiment, the transdifferentiated cell has a morphological, physiological

and/or immunological feature of an glial cell, such as expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP).

It is a benefit of the inventive transdifferentiated cell(s) that they can be implanted into, and/or grafted to, a patient in need for use in cell therapy or gene therapy approaches to neurological injury or disease. Advantageously, the transdifferentiated cell(s) can be used directly without requiring a step for cell expansion.

The present invention also relates to a cell culture derived from the inventive transdifferentiated cell(s) originated from epidermal basal cells. The cell culture contains a plurality of cells that have a morphological, physiological and/or immunological feature of a neural progenitor, neuronal, or glial cell, for example, expression of one or more specific marker(s). The cell culture is maintained under culture conditions that favor the in vitro propagation of neural progenitors, neuronal, or glial cells, for example, suitable temperature, pH, nutrients, and growth factors, as known in the art. The cell culture can be manipulated to express additional or different neural-specific or glial specific-markers in the presence of specific exogenously supplied signal molecules.

The features and properties of the transdifferentiated cells and cell cultures of the present invention make them viable as a fundamental biotechnology tool directed to the human nervous system. Moreover, the transdifferentiated cells and cell cultures of the invention meet the technical criteria for use in cell and gene therapies directed to nervous system disease and disorders. First, the inventive transdifferentiated cells and cell cultures can display morphological and functional features of neurons: they can develop long neurites with a growth cones at the end, they express a number of neural specific genes, and they do not continue to proliferate in conditions which induce differentiation. Therefore, for use in gene therapy and cell therapy, the transdifferentiated cells can not only deliver a single potential gene or factor, but additionally are capable of furnishing the whole infrastructure for nerve regeneration.

Second, the cultured transdifferentiated cells can be propagated as multipotential nervous system progenitor cells in conditions that favor proliferation and do not induce differentiation. Hence, these progenitor cells retain the capacity to become many different types of neurons or neuron-like cells depending upon the environmental cues to which they are exposed, for example GABAergic or dopaminergic cells. This broad plasticity suggests that, once implanted, the cells of the present invention will retain the capacity to conform to

many different host brain regions and to differentiate into neurons specific for that particular host region. These intrinsic properties of the transdifferentiated neurons are different from the existing tumorigenic cell lines, where some neuronal differentiation can be induced under artificial conditions.

5 Third, another advantage of the inventive transdifferentiated cells and cell cultures is that there is no need for cell expansion, as is required with stem cell technology used to generate neurons for cell and gene therapies. Thus, the transdifferentiated cells of the present invention are sufficient in number (several millions of cells) for direct implantation. In summary, the unique characteristics and properties of these transdifferentiated cells and cell
10 cultures yield an invention of significant scientific and commercial potential.

Consequently, the present invention also relates to a method of delivering locally secretable regulatory factors in vivo within the nervous system of a mammalian subject, including a human. The method involves transdifferentiating a population of epidermal basal cells from the subject, in accordance with the inventive method described above, into cells
15 having a morphological, physiological and/or immunological feature of a neuronal cell. Epidermal basal cells of the particular subject requiring treatment with secretable regulatory factors are preferred, in order to avoid transplant rejection. Before, during, or after the transdifferentiation step, the cells are genetically modified, in vitro, by known methods as described above, with an expression vector comprising a DNA encoding a predetermined
20 secretable regulatory factor, a biochemical precursor thereof, or an enzyme that catalyzes the biosynthesis of either the factor or a precursor, and the genetically modified cells are selected, cultured, and implanted into the subject. Transfecting or otherwise genetically modifying the cells involves delivery of an expression vector comprising the DNA encoding the predetermined secretable regulatory factor, a precursor thereof, or an enzyme that catalyzes
25 the biosynthesis of either the factor or a precursor. Expression of the gene for the regulatory factor, precursor, or enzyme is under the transcriptional control of a neuronal specific promoter (for example, neurofilament promoter or neural-specific enolase promoter). Enhanced secretion of the regulatory factor by the genetically modified cells results. This does not depend on the formation of functional interneuronal connections such as those that
30 transmit electrochemical sensory, motor, or cognitive signals.

Examples of secretable regulatory factors include dopamine and neurotrophic factors, such as nerve growth factor (NGF), brain-derived growth factor (BDGF), neurotrophin-3,

neurotrophin-4, insulin-like growth factor, ciliary neurotrophic factor (CNTF), or glia-derived neurotrophic factor. Nervous system disorders that can be treated using the method include Alzheimer's disease, diabetic neuropathy, taxol neuropathy, compressive neuropathy, AIDS-related neuropathy, amyotrophic lateral sclerosis, large fiber neuropathy, vincristine neuropathy, and Parkinson's disease.

Implantation of the genetically modified transdifferentiated cells is by conventional methods (e.g., stereotactic injection). Implantation is into an appropriate site within the nervous system of the subject, depending on the particular disorder being treated.

By way of example, the method is advantageous in the treatment of Parkinson's disease, which results mainly from degeneration of dopamine releasing neurons in the substantia nigra of the brain and the subsequent depletion of dopamine neurotransmitter in the striatum. The cause of this degeneration is unknown, but the motor degeneration symptoms of the disease can be alleviated by peripherally administering the dopamine precursor, L-dopa, at the early onset of the disease. As the disease continues to worsen, L-dopa is no longer effective, and currently, no further treatment is available. One promising treatment being developed is to transplant dopamine-rich substantia nigra neurons from fetal brain into the striatum of the brain of the patient. Results obtained from various clinical studies look extremely optimistic, however, it is estimated that up to 10 fetal brains are needed to obtain a sufficient number of cells for one transplant operation. This requirement renders unfeasible the wide application of the transplantation of primary fetal neurons as a therapeutic treatment modality. This problem is resolved, however, by utilizing the transdifferentiated neurons or neuron-like cells of the present invention for treatment of Parkinson's disease.

It is now widely recognized that transplantation of dopamine producing cells is the most promising therapy of treating severe Parkinson's disease. Stable cell populations or cell lines genetically modified to produce dopamine is essential to an effective therapy. Since tyrosine hydroxylase (TH) is the key enzyme for dopamine biosynthesis, cloning the TH gene into an appropriate expression vector is a first step in the method of treatment. Human TH cDNA is cloned into a eukaryotic expression vector. After gene delivery, clones of genetically modified cells that demonstrate stable integration of the expression vector are selected for implantation purposes. Thus, transdifferentiated cells of the present invention are produced with enhanced expression of the tyrosine hydroxylase (TH) gene.

These cells are implanted into the patient's striatum or brain. The cells are typically

5 implanted bilaterally in the caudate nucleus and putamen by using Magnetic Resonance Imaging (MRI)-guided stereotactic techniques. A stereotactic frame is affixed to the skull after administration of local anesthesia. The caudate nucleus and putamen are then visualized with MRI. Thereafter, under general anesthesia, about 10 passes with very thin stereotactic
10 needles are made bilaterally, 4 mm apart in the caudate and putamen. The rationale for track spacing at approximately 4 mm intervals is important because fetal dopamine neuron processes grow several millimeters, reinnervating the host's striatum. Four trajectories for needle tracks in the caudate and six tracks in the putamen are calculated to avoid the posterior limb of the internal capsule. The entry points for the putamen and caudate tracks are at two
15 different sites on the surface of the brain. The tracks to the putamen are approximately vertical with reference to a coronal plane, while the approach to the caudate is at an angle of approximately 30 degrees. After the implantation surgery, the implanted cells secrete dopamine in situ alleviating the subject's Parkinson's disease symptoms.

The present invention also relates to a method of isolating or identifying a novel nerve
15 growth (or neurotrophic) factor that employs transdifferentiated cells of the invention. The methods involve transdifferentiating a population of proliferating epidermal basal cells into neuronal progenitor cells, neuronal cells, or glial cells; culturing the transdifferentiated cells; exposing the cultured cells, in vitro, to a potential nerve growth factor; and detecting the presence or absence of an effect of the potential nerve growth factor on the survival of the
20 cells or on a morphological or electrophysiological characteristic and/or molecular biological property of the cells. The transdifferentiated cells are assayed in vitro to determine whether there is an effect of a potential nerve growth factor on a physiological or molecular biological property of the transdifferentiated cells. For example, which, if any, neuronal or glial cell types develop from neural progenitors, the maturation of particular cell types, and the
25 continued support of cell survival (e.g., effect on cell numbers) can be determined. In addition, experimental techniques, based on an electrophysiological characteristic (patch clamp, different types of intracellular recording, etc.) or molecular biological properties (gene expression profiles, organization of cytoskeleton, organization of ion channels and receptors etc.) can be used to detect the effects of potential nerve growth/neurotrophic factors on
30 particular cell types. The potential factor can be, but need not be an isolated compound; the inventive transdifferentiated cells can be used to test, or assay, the effect, or lack thereof, of potential growth factor sources (tissue homogenates, expression cDNA library products, etc.) on the survival and functional characteristics of the cells to detect candidates for further

isolation.

The use of transdifferentiated epidermal basal cells bypasses the difficulties in isolating and culturing neuronal cell types from the brain, and, therefore, the inventive method of identifying a novel nerve growth factor is a benefit to research in this area.

5 This same advantage pertains to the inventive method of using cells transdifferentiated from epidermal basal cells to identify a potential chemotherapeutic agent (i.e., a drug) by transdifferentiating a population of epidermal basal cells into neuronal progenitor, neuronal, or glial cells by the inventive method described above; culturing the transdifferentiated cells; exposing the cultured cells, in vitro, to a potential chemotherapeutic agent; and detecting the
10 presence or absence of an effect of the potential chemotherapeutic agent on the survival of the cells or on a morphological or electrophysiological characteristic and/or molecular biological property of said cells. An effect altering cell survival, a morphological or electrophysiological characteristic and/or a molecular biological property of the cells indicates the activity of the chemotherapeutic agent. The potential chemotherapeutic agent can be an
15 agent intended to treat a nervous system disorder, or the method can be used to test an agent intended or proposed for treating any other type of disorder for its effects on cells possessing neural progenitor, neuronal or glial cell features. Experimental assay techniques, based on an electrophysiological characteristic (patch clamp, different types of intracellular recording, etc.) or molecular biological properties (gene expression profiles, organization of cytoskeleton,
20 organization of ion channels and receptors etc.), as well as cell survival, can be used to detect the effects of potential chemotherapeutic agents on particular cell types. The potential chemotherapeutic agent can be, but need not be an isolated compound; the inventive transdifferentiated cells can be used to test, or assay, the effect of potential chemotherapeutic agents (tissue homogenates, expression cDNA library products, etc.) on the survival and
25 functional characteristics of the cells to detect candidates for further isolation and development. Since epidermal basal cells transdifferentiated into neurons or neuron-like cells in culture can express several neurotransmitters and receptor complexes, cell lines derived from these cells can be developed which, when differentiated into mature neurons, would display a unique profile of neurotransmitter receptor complexes. Such neuronal cell lines can
30 be valuable tools for designing and screening potential chemotherapeutic agents.

The present invention also relates to a method of using transdifferentiated cells or cell cultures to screen a potential chemotherapeutic agent to treat a nervous system disorder of

genetic origin, for example, Alzheimer's disease. The method is practiced in accordance with the above-described method of screening a potential chemotherapeutic agent, however, epidermal basal cells derived from a human subject diagnosed with a particular nervous system disorder of genetic origin are transdifferentiated and the effect of the potential chemotherapeutic agent on a physiological or molecular biological property of the transdifferentiated cells is assayed in vitro. Different types of neuronal cells derived from transdifferentiated epidermal basal cells of the present invention will provide novel methodologies to screen potential chemotherapeutic agents. For example, using the epidermal basal cells from patients with genetic defects that affect the nervous system will make it possible to manipulate environmental cues to induce the development of various types of neuronal cell populations that also carry this genetic defect. These cells can be used for screening of chemotherapeutic agents which potentially have effect on the diseased neurons or neuron-like cells displaying a specific set or profile of neurotransmitters, receptors complexes, and ion channels.

Regardless of whether under a particular set of environmental conditions, in vitro, the inventive transdifferentiated cells express all the biochemical, morphological, and functional characteristics of a given neuronal population in vivo, they provide at least useful simulations of neurons for identifying, screening, or isolating promising new drugs or neural growth factors. Once the potential of a chemical agent is identified by the inventive methods, then, further research can be done to verify its actual effect on particular cell populations of the nervous system and ascertain its clinical usefulness. Thus, the inventive methods of screening a potential chemotherapeutic agent are of benefit in finding and developing the next generation of pharmaceutical drugs narrowly aimed at modifying specific brain functions.

The present invention also relates to a kit for transdifferentiating an epidermal basal cell into a cell having one or more morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural progenitor, neuronal, or glial cell. The kit is an assemblage of materials for facilitating the transdifferentiation of epidermal basal cells in accordance with the inventive methods.

The inventive kit preferably includes the following expression vectors and reagents: one or more expression vector(s) containing cDNA(s) encoding a neurogenic transcription factor, or fragment(s) thereof, such as NeuroD1, NeuroD2, ASH1, Zic1, Zic3, and MyT1, or non-human, homologous counterparts, at least one antisense oligonucleotide corresponding

to a segment or portion of the human MSX1 gene and/or the human HES1 gene, or non-human, homologous counterparts, a retinoid and at least one neurotrophin, such as BDNF, CNTF, PDGF, NGF, NT-3, NT-4, and/or sonic hedgehog, or an active fragment of any of these. Preferably but not necessarily, the kit contains instructions for using the kit components for transdifferentiating a mammalian subject's epidermal basal cells, for example, starting with a patient's own skin cells.

The materials or components assembled in the inventive kit can be provided to the practitioner stored in any convenient and suitable ways that preserve their operability and utility. For example the components can be in dissolved, dehydrated, or lyophilized form; they can be provided at room, refrigerated or frozen temperatures. The kits of the present invention preferably include instructions for using the materials or components effectively for practicing any or all of the inventive methods.

The foregoing descriptions of the methods, transdifferentiated cells, cell cultures, and kits of the present invention are illustrative and by no means exhaustive. The invention will now be described in greater detail by reference to the following non-limiting examples.

EXAMPLE I

Preparation of Epidermal Cell Culture and Dedifferentiation

Human adult skin was obtained from surgery procedures or skin biopsy. Before cultivation, as much as possible of the subepidermal tissue was removed by gentle scraping. Primary cultures were initiated by culturing 4-10 2x2 mm explants/35 mm tissue culture dish in Dulbecco's modified Eagle medium (GIBCO-BRL, Life Technologies, Inc.) with 15% fetal calf serum (GIBCO-BRL, Life Technologies, Inc.), 0.4 µg/ml hydrocortisone, and 10 ng/ml epidermal growth factor (Collaborative Research, Inc.). The medium was changed every three days. Thirty to thirty-five day old cultures were used for subsequent experimentation. Before transfections and further treatment, differentiated cell layers were stripped off by incubating the cultures in Ca²⁺-free minimal essential medium (GIBCO-BRL, Life Technologies, Inc.). Generally, a calcium free media contains less than 10⁻⁶ M Ca²⁺ ions. After 72 hours, suprabasal layers were detached and removed after shaking of the culture dish. This calcium free treatment also dedifferentiates epidermal basal cells, as they loose expression of cytokeratines which are characteristic of epidermal cells. The cultures were then refed medium with normal Ca²⁺ concentration, that is, 2mM calcium ions containing all the

additives, that is, FCS (15%), hydrocortisone (0.4 $\mu\text{g/ml}$), EGF (10 ng/ml), and cultured 18-24 hours at 37°C in an atmosphere containing 5% CO_2 .

EXAMPLE II

Transfections of Cultured Epidermal Cells

5 Epidermal basal cells were transfected using a Ca-coprecipitation protocol (GIBCO-BRL, Life Technologies, Inc.), Lipofectamine reagent (GIBCO-BRL, Life Technologies, Inc.), and immunoliposomes (Holmberg et al., 1994). Ca-coprecipitation and Lipofectamine reagent were used as indicated by manufacturer. Ten μg of either pRcCMVneo eukaryotic expression vector (Invitrogen) alone, or cloned pRcCMVneo vectors containing either
10 β -galactosidase (CMV- β -gal), NeuroD1 (CMV-ND1), NeuroD2, (CMV-ND2), HASH1 (CMV-hASH1), Zic1 (CMV-Zic1), or hMyT1 (CMV-MyT1) cDNAs were used to transfect cells in one 35 mm tissue culture dish. All the cDNAs were cloned in our laboratory using sequence information from GenBank: Accession numbers: hNeuroD1 D82347 (SEQ. ID. NOS.:1 and 7); U50822 (SEQ. ID. NOS.:2 and 8); hNeuroD2 U58681 (SEQ. ID. NOS.:3 and
15 9); hASH1 L08424 (SEQ. ID. NOS.:4 and 10); hZic1 D76435 (SEQ. ID. NOS.:5 and 11); hMyT1 M96980 (SEQ. ID. NOS.:6 and 12). All of the cloned genes were of human origin.

 Oligonucleotide primers were designed based on the sequences of interest and used to amplify full length cDNAs using RT-PCR techniques and human fetal brain mRNA as a template. Also, NeuroD1, NeuroD2 and hASH1 cDNAs were isolated by screening the
20 human fetal brain cDNA library (Stratagene). All cDNA sequences were verified by sequencing and *in-vitro* translation using reticulocyte lysate an *in-vitro* translation system (Amersham).

EXAMPLE III

Preparation and Use of Antisense Oligonucleotides

25 Human MSX1 antisense oligonucleotides sequences

1) 5'-GACACCGAGTGGCAAAGAAGTCATGTC (first methionine) (MSX1-1; SEQ. ID. NO.:13); and

2) 5'-CGGCTTCCTGTGGTCGGCCATGAG (third methionine) (MSX1-2; SEQ. ID.

NO.:14) were synthesized. Additionally, human full length HES1 cDNA from the human fetal brain cDNA library was isolated and sequenced (Stratagene). Two antisense oligonucleotides corresponding to the human HES1 open reading frame 5' sequence

1) 5'-ACCGGGGACGAGGAATTTTCTCCATTATATCAGC (HES1-1; SEQ. ID. NO.:15)

5 and middle sequence

2) 5'-CACGGAGGTGCCGCTGTTGCTGGGCTGGTGTGGTGTAGAC (HES1-2; SEQ. ID. NO.:16) were synthesized.

The preferred antisense oligonucleotides are thio-modified by known methods. Therefore, thio-modified versions of these oligonucleotides corresponding to human MSX1 and human HES1 were synthesized and used to increase the stability of oligonucleotides in the culture media and in the cells.

In the experimental protocol, described below, oligonucleotides were directly added to the culture media at the concentration of 5-10 μ M. Randomly synthesized oligonucleotides and oligonucleotides corresponding to the sequence of human albumin were used as controls.

EXAMPLE IV

Analytical Method to Detect Transdifferentiation

Immunohistochemical detection of neurofilament M expression was chosen as one marker for neuronal differentiation. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde and processed according to the immunohistochemical detection protocol recommended by the antibody manufacturer (Sigma, Inc.). Neurofilament M positive cells were counted by fluorescent microscopy. Several additional antibodies to neuronal antigens were used to characterize, in more detail, the nature of basal cell transdifferentiation into neurons. Antibodies against neural specific tubulin (Sigma, Inc.), neural specific enolase (Incstar, Inc.), microtubule associated protein 2 (MAP2, Boehringer Mannheim), and neurofilaments Mix (Sternberger) were used as recommended by the antibody manufacturer. Antibodies against glial fibrillary acidic protein (GFAP, Incstar) were used to detect differentiation of astrocytes from epidermal basal cells. Additionally, morphological criteria were used to detect transdifferentiation of epidermal basal cells into neuronal cells. Cells with neurites, or processes, longer than three cell diameters (50 microns or longer), and expressing at least one neuronal marker (antigen), were counted as neurons.

EXAMPLE V

Transdifferentiation Protocol and Experimental Results

Various combinations of neural regulators leading to expression, or over-expression, of neurogenic bHLH and/or Zn-finger transcription factors and substantially simultaneous suppression of MSX1 and/or HES1 expression were tested to ascertain their effect on transdifferentiation of epidermal basal cells. Results of these experiments are presented in Table 1.

For these experiments, a immunoliposome transfection method is preferred, since it resulted in the highest transfection efficiency. Other methods of transfection that yield high transfection efficiency, such as Ca-coprecipitation, Lipofectamine, or Eugene-6 (Boehringer Mannheim, Inc.), known in the art, can be used instead of immunoliposomes. After transfection and antisense oligonucleotide treatments, cells were grown in the presence of all-trans retinoic acid (10^{-7} M) and BDNF (20ng/ml) for 5 days before immunostaining.

Table 1 shows the results of the transdifferentiation procedures described above leading to the conversion of epidermal basal cells into neuronal Neurofilament—expressing cells *in-vitro*. Various combinations of simultaneous expression, or near simultaneous expression, of neurogenic bHLH and/or Zn-finger transcription factors and suppression of expression of MSX1 and/or HES1 genes were used to initiate transdifferentiation. Neurofilament M immunostaining and evaluation of the length of neurites, or processes (50 microns or longer were counted as neurites) were used to identify neuronal cells. Controls using pRCMV vector plasmid and randomly synthesized oligonucleotides, and oligonucleotides corresponding to the sequence of human albumin, showed no transdifferentiation of epidermal basal cells. Cells expressing Neurofilament M were counted by fluorescent microscopy. Five to seven fields of immuno-stained cells were counted for each treatment, each field containing 100-300 cells.

TABLE I
TRANSDIFFERENTIATION OF EPIDERMAL BASAL CELLS

<u>TREATMENT</u>		<u>% NEURONAL CELLS</u> (i.e., % Neurofilament M expressing)
5	control, no treatment:	0
	Over-expression:	
	NeuroD1	0.01
	NeuroD2	0.03
	ASH1	0
10	Zic1	0
	MyT1	0
	NeuroD1+Zic1	0.04
	NeuroD2+Zic1	0.05
	NeuroD1+NeuroD2+Zic1	0.05
15	NeuroD1+MyT1	0.02
	NeuroD2+MyT1	0.03
	NeuroD1+NeuroD2+MyT1	0.05
	NeuroD1+NeuroD2+MyT1+Zic1	0.05
	Antisense oligonucleotides:	
20	MSX1-1	0
	MSX1-2	0
	HES1-1	0
	HES1-2	0
	MSX1-1+MSX1-2+HES1-1+HES1-2	0

Combination of antisense oligonucleotides and over-expression of neurogenic factors:

	NeuroD1+NeuroD2+MSX1-1+MSX1-2	0.5
	NeuroD1+NeuroD2+HES1-1+HES1-2	0.8
	NeuroD1+NeuroD2+MSX1-1+HES1-1	7
5	Zic1+MSX1-1+MSX1-2	0.05
	Zic1+HES1-1+HES1-2	3
	MyT1+MSX1-1+MSX1-2	0.01
	MyT1+HES1-1+HES1-2	0.5
	MyT1+MSX1-1+HES1-1	0.9
10	NeuroD1+Zic1+MSX1-1	11
	NeuroD1+Zic1+MSX1-1+HES1-1	20
	NeuroD1+MyT1+MSX1-1	10
	NeuroD1+MyT1+MSX1-1+HES1-1	26
	NeuroD1+Zic1+MyT1+MSX1-1+HES1-1	25

15

In summary, transdifferentiation of epidermal cells into neurons is best achieved by the combined effect of expressing neurogenic transcription factors, which positively regulate neuronal differentiation, and antisense oligonucleotides, corresponding to negative regulators of neuronal differentiation. The experimental data indicate that a preferred method of transdifferentiation of epidermal cells into neurons includes the expression of both a bHLH and zinc finger transcription factor, which positively regulate neuronal differentiation, in the presence of at least one antisense DNA, corresponding to a negative regulator of epidermal differentiation. Additionally, the expression of two bHLH transcription factors in the presence of two negative regulator antisense DNAs yielded a fairly high percentage of differentiated neurons.

25

EXAMPLE VI

Characterization of the Transdifferentiated Neuronal Cells

To further evaluate the transdifferentiation process and nature of newly formed neuronal cells, expression of several neuronal marker genes in these cells using immunostaining with specific antibodies against neuronal marker proteins were analyzed. In these experiments, the following combinations of transfection of neurogenic genes and antisense oligonucleotide treatments were used:

NeuroD1+Zic1+MSX1-1+HES1-1

NeuroD1+MyT1+MSX1-1+HES1-1

10 NeuroD1+Zic1+MyT1+MSX1-1+HES1-1

The results of these experiments show that Neurofilament M positive transdifferentiated cells also express neural specific tubulin, neural specific enolase, and microtubule associated protein 2. Expression of a number of neuronal antigens and morphological changes (neurites 50 microns or longer) of transdifferentiated cells shows that the procedure of transdifferentiation results in normal and viable neuronal cells that can be used in cell therapy applications. Moreover, the newly formed neuronal cells of the present invention have the morphological and functional criteria of neurons: they develop long neurites with a growth cones at the end, they express a number of neural specific genes, and they do not continue to proliferate in conditions which induce differentiation, such as, in the presence of all-trans retinoic acid (10^{-7} M) and BDNF (20ng/ml).

Finally, staining of treated epidermal cell cultures with antibodies against glial fibrillary acidic protein shows that small percentage (around 5%) of cells also express GFAP. This is an indication that transdifferentiated cells acquire characteristics of astroglial cells, either directly or indirectly. One possible explanation is that expression of neurogenic genes and blocking expression of inhibitors of neurogenesis results in formation of neuronal progenitor cells that differentiate both neurons and astroglial cells in vitro.

EXAMPLE VII

A Gene Therapy Application for Transdifferentiated Neuronal Cells
in Parkinson's Disease

30 Parkinson's Disease results mainly from degeneration of dopamine releasing neurons

in the substantia nigra of the brain and the resulting depletion of dopamine neurotransmitter in the striatum. The cause of this degeneration is unknown, but the motor degeneration symptoms of the disease can be alleviated by peripherally administering the dopamine precursor, L-dopa, at the early onset of the disease. As the disease continues to worsen, L-dopa is no longer effective, and currently, no further treatment is available. One promising treatment being developed is to transplant dopamine-rich substantia nigra neurons from fetal brain into the striatum of the brain of the patient. Results obtained from various clinical studies look extremely optimistic, however, it is estimated that up to 10 fetal brains are needed to obtain a sufficient number of cells for one transplant operation. This requirement renders unfeasible the wide application of the transplantation of primary fetal neurons as a therapeutic treatment modality. This problem is resolved, however, by utilizing the transdifferentiated neuronal cells of the present invention for treatment of Parkinson's disease.

It is now widely recognized that transplantation of dopamine producing cells is the most promising therapy of treating severe Parkinson's disease. Stable cell populations or cell lines genetically engineered to produce dopamine is essential to an effective therapy. Since tyrosine hydroxylase (TH) is the key enzyme for dopamine synthesis, cloning this gene in an appropriate expression vector is a first step in the method of treatment. Thus, human TH cDNA will be cloned into eukaryotic expression vector under the control of neuronal specific promoter (for example, neurofilament, neural specific enolase). Expression constructs will be transfected into epidermal basal cells of a patient, using high efficiency transfection protocols (Lipofectamine, Ca-coprecipitation etc.), followed by selection of the clones which demonstrate stable integration of the expression vector. These clones will be used for transdifferentiation procedures to obtain newly formed neurons that express TH. Thus, human neurons derived from transdifferentiated cells of the present invention will be produced which express the tyrosine hydroxylase (TH) gene. These cells will be transplanted into the patient's striatum or brain. First, the cells will be implanted bilaterally in the caudate nucleus and putamen by using Magnetic Resonance Imaging (MRI)-guided stereotactic techniques. The stereotactic frame will be fixed to the skull after administration of local anesthesia. The caudate nucleus and putamen then will be visualized with MRI. Thereafter, under general anesthesia, ten passes with very thin stereotactic needles will be made bilaterally, 4 mm apart in the caudate and putamen. The rationale for track spacing at approximately 4 mm intervals is important because fetal dopamine neuron processes grow

several millimeters, reinnervating the host's striatum. Four trajectories for needle tracks in the caudate and six tracks in the putamen will be calculated to avoid the posterior limb of the internal capsule. The entry points for the putamen and caudate tracks will be at two different sites on the surface of the brain. The tracks to the putamen will be approximately vertical with reference to a coronal plane, while the approach to the caudate will be at an angle of approximately 30 degrees.

EXAMPLE VIII

A Gene Therapy Application for Transdifferentiated Neuronal Cells for the Delivery of Nerve Growth Factors to the Brain

The transdifferentiated neuronal cells of the present invention can be transfected with nucleic acids encoding nerve growth (neurotrophic) factors of potential interest. Primary examples of growth factors currently in clinical trials or under full development by various companies are listed below in Table II. So far, tests of the effects of growth factors on the brain and nervous system have been limited to direct peripheral injection of large doses of these factors, which carries a significant risk of side effects, since most growth factors affect many different populations of neurons and non-neural tissues. These problems can be overcome by generating transdifferentiated neuronal cell lines that stably express these growth factors and secrete the growth factors after transplantation.

20

TABLE II

NEUROTROPIC FACTORS AND DISEASES

<u>NEUROTROPIC FACTOR</u>	<u>DISEASE</u>
Nerve growth factor (NGF)	Alzheimer's Disease Diabetic neuropathy Taxol neuropathy Compressive neuropathy AIDS-related neuropathy Amyotrophic lateral sclerosis
Brain-derived growth factor (BDNF)	
Neurotrophin 3 (NT-3)	Large fiber neuropathy
Insulin-like	Amyotrophic lateral sclerosis

25

30

growth factor (IGF)

Vincristine neuropathy

Taxol neuropathy

Ciliary neurotrophic
factor (CNTF)

Amyotrophic lateral sclerosis

5

Glia-derived
neurotrophic factor

Parkinson's Disease

10 Local delivery of neurotrophic factors has been suggested as a method to treat several
neurological conditions (see Table II). Transdifferentiated epidermal cells from patients own
skin represent a vehicle for neurotrophic factor delivery. Human neurotrophic factors
cDNAs will be cloned into eukaryotic expression vector under the control of neuronal
specific promoter (for example, neurofilament or neural specific enolase). Expression
constructs will be transfected into epidermal basal cells using high efficiency transfection
15 protocols (Lipofectamine, Ca-coprecipitation etc.). This procedure is followed by selection
of the clones that demonstrate stable integration of expression vector. These clones will then
be used for transdifferentiation procedures to obtain newly formed neurons that express
particular neurotrophic factors at significantly high levels. Neuronal cells that express these
neurotrophic factors will be transplanted into the patients brain and/or nervous system, as
described in Example VII, into locations which are in need of neurotrophic factor delivery.

20

EXAMPLE IX

A Cell Therapy Application for Transdifferentiated Neuronal Cells as a Treatment for Neurotraumas, Stroke and Neurodegenerative Disease

25 In most neurological diseases, unlike Parkinson's Disease, the underlying cause of
symptoms cannot be attributed to a single factor. This condition renders the therapeutic
approach of introducing a single gene by gene therapy or single neuronal type replacement
by cell therapy ineffective. Rather, replacement of the lost, or diseased, host neuronal cells,
or even neuronal networks, by healthy cells and neuronal networks is required. The present
invention enables us to develop different types of neurons from a patient's own epidermal
basal cells. These newly formed neurons can be cultured separately, or together, to stimulate
30 formation of functional neuronal networks that can be used for replacement therapies.
Alternatively, different types of neurons can be transplanted and induced to form functional

connections between themselves and host neurons, *in situ*, in the brain or in the spinal cord. Ability to differentiate *de novo*, formed neurons into variety of neuronal types *in vitro* and *in vivo* makes this approach especially powerful and useful for replacement of complex structures and networks in the nervous system.

5 As an example for restoring local circuitry in the nervous system is the formation of a functional "pattern generator" in the injured spinal cord. Several data demonstrate that a pattern generator functions in humans, and moreover, that physical therapy can stimulate stepping and use of legs in spinal cord injury patients. (For a review, see Wickelgren, I. 1998. Teaching the spinal cord to walk. Research News. *Science* 279, 319-321. 1998). The pattern
10 generator involves different types of interneurons that connect sensory afferents and motoneurons. Transdifferentiated epidermal basal cells will be treated so as to form all major neuronal cell types that are required for functioning of pattern generator. Here cells will be mixed together wherein natural synapse formation will occur. Since pattern generators are composed of major excitatory (glutamatergic, cholinergic) and inhibitory
15 (glycinergic including Renshaw cells, GABAergic) neurons, first, these neuronal types will be generated by the methods of the present invention described above. Second, excitatory and inhibitory neurons produced in the first step will be grown in co-cultures to stimulate formation of functional connections between the neuron cells. This step will yield aggregates of cells which will be transplanted into the injured spinal cord of a patient. An
20 alternative approach will be to develop different neuronal cell types separately, and mix these before transplantation into the spinal cord. By use of these procedures which permits the transplantation of a large number of different excitatory and inhibitory neurons, a functional set of neuronal connections, capable of supporting local functions of the spinal cord will be developed.

25

EXAMPLE X

Use of Transdifferentiated Neuronal Cells as a Research Tool in the Search for Novel Growth Factors

One of the central principles of modern neurobiology is that each of the major projection neurons, if not all neurons, requires specific signals (trophic factors) to reach their
30 target cells and survive. Neuropathies in many diseases may be caused by, or involve lack of, such growth factors. These growth factors represent the next generation of preventative

and therapeutic drugs for nervous system disorders, and hence the enormous capitalization has been invested in the search and development of novel growth factors by the biotechnology industry.

5 Implicit in the observation that mature neurons can be produced from transdifferentiated neurons is the fact that various growth factors can be tested using these cells to assay for final determination of cell types, maturation, and continued support of cell survival. Most of the growth factors known so far in the nervous system were discovered by their effects on peripheral nerves and these most likely represent a very minor fraction of existing growth factors in the brain.

10 Search for growth factors from the brain has been difficult mainly because particular neuronal cell types are difficult to isolate from the brain and maintain in defined culture conditions. The use of transdifferentiated epidermal cells overcomes this problem and opens new assays to screen potential growth factors.

15 The different types of neuronal cells that are created from transdifferentiated epidermal basal cells provides a novel research tool for the discovery and analyses of the effect of new, and also already characterized, growth/neurotrophic factors. Epidermal basal cells will be transdifferentiated into different types of neuronal cells characterized by a particular subtype of neurons. These specific neuronal cells will be used to test, or assay, the effect of potential growth factor sources (tissue homogenates, expression cDNA library products, etc.) on the survival and functional characteristics of cells. For example, cell number will be counted for the analysis of survival of neuronal cells after exposure to growth factors. A wide spectrum of experimental analyses of the functional characteristics of these neurons, known in the art, can be performed to assay the effect of these novel growth factors on the newly created neurons. Experimental techniques, based on an electrophysiological characteristic (patch clamp, different types of intracellular recording, etc.) and molecular biological (gene expression profiles, organization of cytoskeleton, organization of ion channels and receptors etc.) will be used to detect effects of potential growth/neurotrophic factors on particular cell types.

EXAMPLE XI

30 Use of Transdifferentiated Neuronal Cells as a Research Tool in Drug Screening

As more and more neurotransmitter receptors and signal transducing proteins are being identified from the brain, it is becoming clear that the dogma of one neurotransmitter

activating one receptor is an over-simplification. Most receptor complexes in neurons are composed of protein subunits encoded by several genes and each gene synthesizes many different variations of the protein. These variations result in a wide range of possible receptor combinations, and not a single receptor that can interact with a neurotransmitter. Consequently, a range of signal output may be produced by a single neurotransmitter action. The specific signal effected by a neurotransmitter on a neuron, then, depends on which receptor complex is produced by the cell. Thus, cellular diversity must parallel the molecular diversity and constitute a major structural element underlying the complexity of brain function.

10 Drug discovery by traditional pharmacology had been performed without the knowledge of such complexity using whole brain homogenate and animals. These studies mostly produced analogs of neurotransmitters with broad actions and side effects. The next generation of pharmaceutical drugs aimed at modifying specific brain functions may be obtained by screening potential chemicals against neurons displaying a specific profile of neurotransmitters, receptors complexes, and ion channels.

15 Epidermal basal cells transdifferentiated into neurons in culture can express several neurotransmitters and receptor complexes. Cell lines derived from these cells can be developed which, when differentiated into mature neurons, would display a unique profile of neurotransmitter receptor complexes. Such neuronal cell lines will be valuable tools for designing and screening potential drugs.

20 Regardless of whether under a particular set of environmental conditions, in vitro, the inventive transdifferentiated cells express all the biochemical, morphological, and functional characteristics of a given neuronal population in vivo, they provide at least useful simulations of neurons for identifying, screening, or isolating promising new drugs or neural growth factors. Once the potential of a chemical agent is identified by the inventive methods, then, further research can be done to verify its actual effect on particular cell populations of the nervous system and ascertain its clinical usefulness. Thus, the inventive methods of screening a potential chemotherapeutic agent are of benefit in finding and developing the next generation of pharmaceutical drugs narrowly aimed at modifying specific brain functions.

30 Different types of neuronal cells created from transdifferentiated epidermal basal cells of the present invention will provide novel methodologies to screen potential drugs. For example, using the epidermal basal cells from patients with genetic defects that affect nervous

system will make it possible to create various types of neuronal cells which also carry this genetic defect. These cells will be used for screening of drugs which potentially have effect on the diseased neurons. Epidermal basal cells will be transdifferentiated into various types of neuronal cells with characteristics of the desired subtype of neurons. These specific neuronal cells will be used to test, or assay, the effect of potential drugs on the survival and functional characteristics of the cells. Cell number will be counted for the analysis of survival of neuronal cells after exposure to drugs. A wide spectrum of electrophysiological (patch clamp, different types of intracellular recording etc.) and molecular biological (gene expression profiles, organization of cytoskeleton, organization of ion channels and receptors etc.) techniques can be used to detect effects of potential drugs on particular cell types.

In summary, the transdifferentiation nerve cell technology of the present invention offers broad and significant potentials for treating nervous system disorders in both the areas of cell and gene therapy, as well as offering a potential new source of human neurons for research and drug screening.

While the invention can be described in connection with what is presently considered to be the most practical and preferred embodiments, it is to be understood that the invention is not limited to the disclosed embodiments, but on the contrary is intended to cover various modifications and equivalent arrangements included within the spirit and scope of the description of the invention and the appended claims. Thus, it is to be understood that variations in the present invention can be made without departing from the novel aspects of this invention as described in the specification and defined in the claims.

SEQUENCE LISTING

<110> Cedars-Sinai Medical Center
Michel F. Levesque, M.D.
Toomas Neuman, Ph.D.

<120> Transdifferentiation of Transfected Epidermal
Basal Cells Into Neural Progenitor Cells, Neuronal Cells
And/Or Glial Cells

<130> CEDAR 044303

<140> 09/234,332

<141> 1999-01-20

<160> 16

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 2502

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> gene

<222> (0)...(0)

<223> Neuro D1 gene: Genbank accession D82347

<400> 1

cggccacgac	acgaggaatt	cgccccacgca	ggaggcacgg	cgtccggagg	ccccagggtt	60
atgagactat	cactgctcag	gacctactaa	caacaaagga	aatcgaaaca	tgaccaaata	120
gtacagcgag	agtgggctga	tgggagagcc	tcagcccaaa	ggtcctccaa	gctggacaga	180
cgagtgtctc	agttctcagg	acgaggagca	cgaggcagac	aagaaggagg	acgacctcga	240
agccatgaac	gcagaggagg	actcactgag	gaacggggga	gaggaggagg	acgaagatga	300
ggacctggaa	gaggaggaag	aagaggaaga	ggaggatgac	gatcaaaagc	ccaagagacg	360
cggcccaaaa	aagaagaaga	tgactaaggc	tcgcctggag	cgttttaaat	tgagacgcat	420
gaaggctaac	gcccgggagc	ggaaccgcat	gcacggactg	aacgcggcgc	tagacaacct	480
gcgcaagggt	gtgccttgct	attctaagac	gcagaagctg	tcacaaatcg	agactctgcg	540
cttggccaag	aactacatct	gggtctctgt	ggagatcctg	cgctcaggca	aaagcccaga	600
cctggctctc	ttcgttcaga	cgctttgcaa	gggcttatcc	caaccaccca	ccaacctggt	660
tgggggctgc	ctgcaactca	atcctcggac	ttttctgcct	gagcagaacc	aggacatgcc	720
ccccacctg	ccgacggcca	gcgcttcctt	ccctgtacac	ccctactcct	accagtgcgc	780
tgggtgccc	agtcgcctt	acggtaccat	ggacagctcc	catgtcttcc	acgttaagcc	840
tcgcgcgcac	gcctacagcg	cagcgcctga	gcccttcttt	gaaagccctc	tgactgattg	900
caccagccct	tcctttgatg	gacccctcag	cccgcgcctc	agcatcaatg	gcaacttctc	960
tttcaaacac	gaaccgtccg	ccgagtttga	gaaaaattat	gcctttacca	tgacttatcc	1020
tgacgcgaca	ctggcagggg	cccaaagcca	cggatcaatc	ttctcaggca	ccgctgcccc	1080
tcgctgcgag	atccccatag	acaatattat	gtccttcgat	agccattcac	atcatgagcg	1140
agtcattgag	gcccagctca	atgccatatt	tcattgattag	aggcagccca	gtttcaccat	1200
ttccgggaaa	cgaacccact	gtgccttacag	tgactgtcgt	gtttacaaaa	ggcagccctt	1260

tgggtactac	tgctgcaaag	tgcaaatact	ccaagcttca	agtgatatat	gtatttattg	1320
tcattactgc	ctttggaaga	aacaggggat	caaagttcct	gttcacctta	tgtattattt	1380
tctatagctc	ttctatttaa	aaaataaaaa	aatacagtaa	agtttaaaaa	atacaccacg	1440
aatttggtgt	ggctgtattc	agatcggtatt	aattatctga	tcgggataac	aaaatcacaa	1500
gcaataatta	ggatctatgc	aattttttaa	ctagtaatgg	gccaattaaa	atatatataa	1560
atataatatt	ttcaaccagc	attttactac	ttgttacctt	tcccatgctg	aattattttg	1620
ttgtgatttt	gtacagaatt	tttaatgact	ttttataatg	tggatttcct	attttaaaac	1680
catgcagctt	catcaatttt	tatacatatc	agaaaagtag	aattatatct	aattttatata	1740
aaataaattta	actaatttta	accagcagaa	aagtgccttag	aaagttattg	tgttgccctta	1800
gcacttcttt	cctctccaat	tgtaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaattg	1860
cacaatttga	gcaattcatt	tcacttttaa	gtctttccgt	ctccctaaaa	taaaaaccag	1920
aatcataaatt	ttcaagagga	gaaaaaatta	agagatacat	tccctatcac	aacatatcaa	1980
ttcaacacat	tacttgacac	agcttggtata	tacatattat	aaatagatgc	caacataccc	2040
ttctttaaat	cacaagctgc	ttgactatca	catacaattt	gcactgttac	tttttagtct	2100
tttactcctt	tgcattccat	gattttacag	agaatctgaa	gctattgatg	tttccagaaa	2160
atataaatgc	atgattttat	acatagtcac	ccccatgggtg	ggttgtcata	tattcatgta	2220
ataaatctga	gcctaaatct	aatcagggtg	ttaatggttg	gagttatata	tatagtagtc	2280
aattagtaca	gtagcttaaa	taaattcccc	ccatttaatt	cataattaga	acaatagcta	2340
ttgcatgtaa	aatgcagtc	agaataagtg	ctgtttgaga	tgtgatgctg	gtaccactgg	2400
aatcgatctg	tactgtaatt	ttgtttgtaa	tcctgtatat	tatggtgtaa	tgcaaattt	2460
agaaaacatt	catccagttg	caataaaata	gtattgaaag	tg		2502

<210> 2

<211> 1676

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> gene

<222> (0)...(0)

<223> Neurogenic helix-loop-helix protein (Neurod 1)
gene

Genbank accession J50822

<400> 2

acatcgatta	acttttttctc	agaggcattc	attttgtaat	gggcaggtag	ttttcgcaag	60
catttgta	ggttttagga	gtggaagctg	aaggcgatct	ttcttttgat	atagcgtttt	120
tctgcttttc	tttctgtttg	cctctccctt	gttgaatgta	ggaaatcgaa	acatgaccaa	180
atcgtaacgc	gagagtgggc	tgatgggcga	gcctcagccc	caaggtcctc	caagctggac	240
agacgagtgt	ctcagttctc	aggacgagga	gcacgaggca	gacaagaagg	aggacgacct	300
cgaagccatg	aacgcagagg	aggactcact	gaggaacggg	ggagaggagg	aggacgaaga	360
tgaggacctg	gaagaggagg	aagaagagga	agaggaggat	gacgatcaaa	agcccaagag	420
acgcggcccc	aaaaagaaga	agatgactaa	ggctcgccctg	gagcgtttta	aattgagacg	480
catgaaggct	aacgcccggg	agcggaaaccg	catgcacgga	ctgaacgcgg	cgctagacaa	540
cctgcgcaag	gtggtgcctt	gctattctaa	gacgcagaag	ctgtccaaaa	tcgagactct	600
gcgcttgccc	aagaactaca	tctggcctct	gtcggagatc	tcgcgctcag	gcaaaagccc	660
agacctggct	tccttcgttc	agacgctttg	caagggttta	tcccaacca	ccaccaacct	720
ggttgcgggc	tgccctgcaac	tcaatcctcg	gactttttctg	cctgagcaga	accaggacat	780
gccccgcac	ctgcgcagcg	ccagcgcttc	cttccctgta	cacctact	cctaccagtc	840
gcctgggctg	cccagtcgc	cttacgctac	catggacagc	tcccatgtct	tcacggttaa	900
gcctccgcg	cagccctaca	gcgcagcgct	ggagcccttc	tttgaaagcc	ctctgactga	960
ttgcaccagc	ccttcctttg	atggaccct	cagcccgccg	ctcagcatca	atggcaactt	1020
ctctttcaaa	cacgaaccgt	cgcgcgagtt	tgagaaaaat	tatgccttta	ccatgcacta	1080
tcctgcagcg	acactggcag	gggcccgaag	ccacggatca	atcttctcag	gcaccgctgc	1140

```

ccctcgtctg gagatcccca tagacaatat tatgtccttc gatagccatt cacatcatga 1200
gcgagtcatt agtgcccgag tcaatgccat atttcatgat tagaggcagc ccagtttcac 1260
catttcgggg aaacgaaccc actgtgctta cagtgaactgt cgtgtttaca aaaggcagcc 1320
ctttgggtact actgctgcaa agtgcaaata ctccaagctt caagtgatat atgtatttat 1380
tgtcattact gcctttggaa gaaacagggg atcaaagttc ctgttcacct tatgtattat 1440
tttctataga ctcttctatt ttaaaaaata aaaaaataca gtaaagttaa aaaaatacac 1500
cacgaatttg gtgtggctgt attcagatcg tattaattat ctgatcggga taacaaaatc 1560
acaagcaata attaggatct atgcaatttt taaactagta atgggccaat taaaatatat 1620
ataaatatat atttcaacca gcattttact actcgttacc tcccatgctg aattat 1676

```

```

<210> 3
<211> 1550
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> gene
<222> (0)...(0)
<223> Neurogenic basic-helix-loop-helix protein (Neuro
      D2) gene Genbank Accession U58681

```

```

<221> unsure
<222> (1219)...(1226)
<223> n at 1219 and 1226; n = A, T, G, or C

```

```

<400> 3
cccccaactt tgtgtgtgtt gtctcccttc cccgcccgcg gggcgccctc aggcaccatg 60
ctgacccgcc tggttcagcga gcccgccctt ctctcgagac tgcccaagtt cgcagctgg 120
ggcgacggcg aagacgacga gccgaggagc gacaaggggc acgcgcgcgc accgccaccg 180
cctgcgcgcg ggccaggggc tccggggcca gcccgggcgg ccaagccagt cctctccgt 240
ggagaagagg ggacggaggc cacgttgcc gaggtcaagg aggaaggcga gctgggggga 300
gaggaggagg aggaagagga ggaggaagaa ggactggacg aggcggaggg cgagcggccc 360
aagaagcgcg ggcaccaaga gcgcaagatg accaaggcgc gcttgagagc ctccaagctt 420
cgccggcaga aggcgaacgc gcgggagcgc aaccgcctgc acgacctgaa cgcagccctg 480
gacaacctgc gcaaggttgt gccctgctac tccaagacgc agaagctgtc caagatcgag 540
acgctgcgcc tagccaagaa ctatatctgg gcgctctcgg agatcctgcg ctccggcaag 600
cggccagacc tagtgtccta cgtgcagact ctgtgcaagg gtctgtcgca gccaccacc 660
aatctggtgg ccggtgtgtt gcagctcaac tctcgcaact tctcacgga gcaaggcgcc 720
gacggtgccg gccgcttcca cggctcgggc ggcccgttcg ccattgaccc ctaccctgac 780
ccgtgctcgc gcttgccggg cgcacagtgc caggcgcccg gcggcctggg cggcgggcgc 840
ggcagcgcgc tgcggaccca cggctactgc gccgcctacg agacgctgta tgcggcggca 900
ggcgggtggc gcgcgagccc ggactacaac agctccgagt acgagggccc gctcagcccc 960
ccgctctgtc tcaatggcaa cttctcactc aagcaggact cctcgcccga ccacgagaaa 1020
agctaccact actctatgca ctactcggcg ctgcccgggt cgcggcccac gggccacggg 1080
ctagtcttcg gctcgtcggc tgtgcgcggg ggcgtccact cggagaatct cttgtcttac 1140
gatatgcacc ttcaccacga ccggggcccc atgtacgagg agctcaatgc gttttttcat 1200
aactgagact tcgcgcgcgc tccctncttt ttcttttgcc tttgcccgc cccctgtccc 1260
cagccccagc agcgcaggga cccccccatc ctaccccggc gccggggcgc gggagcgggc 1320
caccggtcct gccgctctcc tggggcagcg cagtcctgtt acctgtgggt ggcctgtccc 1380
aggggcctcg cttccccagc gggactcgcc ttctctcccc aaggggttcc ctctctctct 1440
ctcccaagga gtgcttctcc agggacctct ctccgggggc tccctggagg caccctctcc 1500
ccattcccaa tatcttcgct gaggtttcct cctccccctc ctccctgcag 1550

```

<210> 4
<211> 1635
<212> DNA
<213> Homo sapiens

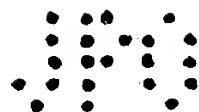
<220>
<221> gene
<222> (0)...(0)
<223> Achaete scute homologous protein (ASH1) gene;
Genbank accession L08424

<400> 4
cccagagacc ggcgcaagag agcgagcct tagtaggaga ggaacgcgag acgcggcaga 60
gcgcgttcag cactgacttt tgctgctgct tctgcttttt tttttcttag aaacaagaag 120
gcgccagcgg cagcctcaca cgcgagcgcc acgcgaggct cccgaagcca acccgcgag 180
ggaggagggg agggaggagg aggcggcgtg caggaggagg aaaaagcatt ttcacctttt 240
ttgctccac tctaagaagt ctccggggga ttttgatat attttttaac ttccgtcagg 300
gtcccgctt catatttctt tttttttccc tctctgttcc tgcacccaag ttctctctgt 360
gtccccctcg cgggccccgc acctcgcgct cgggacgct ctgattccgc gactccttgg 420
ccgcgcgtgc gcatggaaag ctctgccaaag atggagagcg gcggcgccgg ccagcagccc 480
cagccgcagc cccagcagcc ctctctgccc cccgcagcct gtttctttgc cacggccgca 540
gcccgggcgg ccgcagccgc cgcagcggca gcgcagagcg cgcagcagca gcagcagcag 600
cagcagcagc agcagcagca gcaggcgccg cagctgagac cggcgggccga cggccagccc 660
tcagggggcg gtcacaagtc agcgcccaag caagtcaagc gacagcgctc gtcttcgccc 720
gaactgatgc gctgcaaacg ccggctcaac ttcagcggct ttggctacag cctgcgcgag 780
cagcagccgg ccgcctggtg gcgcgcgaac gagegcgagc gcaaccgcgt caagttggtc 840
aacctgggct ttgccacct tcgggagcac gtccccaacg gcgcggccaa caagaagatg 900
agtaagggtg agacactgcg ctccggcggtc gactacatcc gcgcgctgca gcagctgctg 960
gacgagcatg acgcggtgag cgcgccttc caggcaggcg tctgtctgcc caccatctcc 1020
cccaactact ccaacgactt gaactccatg gccggctcgc cggctctcgc ctactcgtcg 1080
gacgagggtc cttacgaccc gctcagcccc gaggagcagg agcttctcga cttcaccaac 1140
tggttctgag gggctcggcc tggtcaggcc ctgggtcgaa tggacttttg aagcaggggtg 1200
atgcacaaac ctgcatcttt agtgctttct tgtcagtggc gttgggaggg ggagaaaagg 1260
aaaagaaaaa aaaagaagaa gaagaagaaa agagaagaag aaaaaaacga aaacagtcaa 1320
ccaaccccat cgccaactaa gcgaggcatg cctgagagac atggctttca gaaaacggga 1380
agcgctcaga acagtatctt tgcactccaa tcattcacgg agatatgaag agcaactggg 1440
acctgagtca atgcgcaaaa tgcagcttgt gtgcaaaagc agtgggctcc tggcagaagg 1500
gagcagcaca cgcgttatag taactcccat cacctctaac acgcacagct gaaagtctct 1560
gtcgggttcc ctacacctcc ccgccttttc ttagagtga gttcttagcc ctctagaaac 1620
gagttggtgt ctttc 1635

<210> 5
<211> 3138
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> gene
<222> (0)...(0)
<223> Zic 1 Protein gene; Genbank Acession D76435

<400> 5
cgggtgccat gcagctttct ctaatttget ctacgttccct ggctatgaat tgctaaacta 60
tcagtctcgc gctcaccgcc cggctgagga ggtgaaagtt tctcccaggg aagataaac 120



gcaaaagaca	tatattgtgc	atgatttgcg	ccttttcttt	ggctttttct	ttctttcttc	180
acccccccac	ccactttttt	tttttttttt	ttcaaaaagc	agagagggaa	aaacggagag	240
tgaaggagcg	aggaggcgag	cgtgagagaa	aggagagaga	gagaaaagaa	agggcgaggg	300
gctagtggag	gaaggaagga	ggggcggtcg	cgcgaggcgg	agagagggcg	aagcagtcgc	360
ggcactggcg	ctcacattcc	tctatgctac	aaatccagga	ggaagttttt	ttttaggggg	420
ctgagatgct	ccatgccttt	aaaagggcag	ccttgacgcg	cgccctctct	ggcagagact	480
gagcggcgag	aaagtgcgag	ccggggcggc	agaatctgcc	tggcggggcg	tggagcctgc	540
gttactcgcg	gcccgcagcc	gtccggctac	tttgcgtttg	gcccggccag	cgcgcgcggg	600
cgcgcgcgcg	ccattgcctg	caggctagga	cttcgcgagg	tgggtcgact	cacctctcct	660
cctcctcttc	ttcctcctct	tectcctcct	cttgttctct	ctcctcctcc	cgattttccc	720
tectcggctg	gcgagggtgg	ggggggcggg	ggaggccggg	gctcgcctcg	agcagccacg	780
atgetcctgg	acgcccggcc	ccagtaccca	gcgatcggcg	tgaccacctt	tggcgcgtcc	840
cgccaccact	ccgcgggcga	cgtggccgaa	cgagacgtgg	gcctgggcat	caacccgttc	900
gccgacggca	tgggcgcctt	caagctcaac	cccagttcgc	acgagctgge	ttcggccggc	960
cagacagcct	tcacgtcgca	ggcgccaggc	tacgcggctg	ctgcggccct	gggccatcac	1020
catcaccccg	gccacgtcgg	ctcctattcc	agcgcagcct	tcaactccac	gcgggacttt	1080
ctgttcgcga	accgggggtt	tggcgacgcg	gcggcggcag	ccagcgcaca	gcacagcctc	1140
tttgctgcat	cggccggggg	cttcgggggc	ccacacggcc	acacggacgc	cgcgggccac	1200
ctcctcttcc	ccgggcttca	cgagcagget	gcccggccacg	cgtcgcctaa	cgtggtcaac	1260
gggcagatga	ggctcggctt	ctcgggggac	atgtaccgcg	gaccggagca	gtacggccag	1320
gtgaccagcc	cgcgttcgga	gcactatgct	gcgcgcgagc	tgacgggcta	cggggcccatg	1380
aacgtgaaca	tggccgcgca	tcacggcgcc	ggcgccctct	tccgctacat	gcgccaaccc	1440
atcaagcaag	agctcatctg	caagtggatc	gagcccgagc	agctggccaa	ccccaaaaag	1500
tcgtgcaaca	aaactttcag	caccatgcac	gagctagtta	cgcacgtcac	cgtggagcac	1560
gtaggtggcc	cggagcagag	taatcacatc	tgcttctggg	aggagtgtcc	gcgcgagggc	1620
aagcccttca	aagccaaata	caaactgggt	aaccacatcc	gcgtgcacac	gggcgagaag	1680
ccctttccct	gccccttccc	tggctgtggc	aaggctctcg	cgcgctccga	gaatttaaag	1740
atccacaaaa	ggacgcacac	aggggagaag	cccttcaagt	gcgagtttga	gggctgtgac	1800
cggcgcttcg	ctaacagcag	cgaccgcaag	aagcacatgc	acgtgcacac	gagcgacaag	1860
ccctatcttt	gcaagatgtg	cgacaagtcc	tacacgcate	ccagttccgt	gcgcaaacac	1920
atgaaggtcc	acgaatcctc	ctcgcagggc	tccgagcctt	cgcggccgcg	cagctctggc	1980
tacgaatcct	ccacgcctcc	caccatcggt	tctccctcca	cagacaaccc	gaccacaagc	2040
tccttatcgc	cctcctcctc	cgcagtccac	cacacagccg	gccacagtgc	gctctcttcc	2100
aatttttaacg	aatggtacgt	ttaaaatcag	aaacaaaaca	tcgaacaaaa	ccctatttaa	2160
gagacttgat	cacacacgta	tacacaacat	tactgaaaga	accctgcgaa	tcaaaacaac	2220
ccccacacag	accccgcaat	cctcttttaa	aaaatctgcc	aatagaccca	ggacgagtaa	2280
gagaggaagc	atcaaccttt	taaaaatttc	ctttcgcttt	cattattttt	cttttttttg	2340
caaaggcttg	gtaccaaggg	tgcggtaggg	ggtcgagggg	gaggaggcca	cctgacccaa	2400
tgccgccaac	cccgagggcc	agtttcttgt	cgaattggta	cgggctctct	ggggcttcgg	2460
cttctttttt	tctttgtttt	cttgtaaata	cagaattatt	agcttaaaac	tgtactgttg	2520
aattctgtaa	atagttatat	ctcggttgga	gcgggtgggt	gggattgtgg	cgttgtggtc	2580
tttgcatttg	gggagggggg	agggaccgga	tgggcggggg	gagggggagg	gggaggggtg	2640
ggcggccgaa	agccaactgt	ttgtactgaa	tggcaagaat	gttctagtaa	atgtgtacca	2700
aaatgtgaat	tactttgtac	gattacagtc	tccacgtcga	cctaaccsaa	tattattggt	2760
attaatgtgc	tttttttgta	taaagtgcaa	acatttcgtc	ccaaagtcta	agtactttag	2820
tgcagtaaaa	tggtgtttca	tgtcctgtca	agaattcgta	tagtacgagc	ctggatctgc	2880
gtgtcaaact	gttccatttg	tttatgtaaa	gtgatattaa	aaaagatata	aactataact	2940
gtccgttact	tttggaacaa	gatacaacca	cataatgtat	ataattccta	gtttccatat	3000
ttatccgcgt	gtaaagggcc	ggtttatcca	tggtacagct	cttcaatatt	tatggctaga	3060
agaactcgta	tgtacacttt	agtttccaga	actgtttggc	aacctttcgt	accttattaa	3120
agattcttaa	atctcaaa					3138

<210> 6

<211> 2623

<212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> gene
 <222> (0)...(0)
 <223> Myelin transcription factor 1 (MyT1) gene Genbank
 Accession M96980

<400> 6

cggaagagtt	actacagtaa	agatccttca	agagctgaga	agcgtgagat	caagtgtcca	60
acaccaggct	gtgatggcac	tggccacgtt	accgggttgt	accctcacca	ccgcagcctt	120
tctggctgtc	cccacaagga	taggatcccc	ccagagatct	tagccatgca	tgagaacgtg	180
ctgaagtgcc	ccactcctgg	ctgcacaggg	cagggtcacg	tgaacagcaa	ccgcaacacg	240
cacagaagtt	tgtctgggtg	tcccattgct	gccgccgaaa	aattagccaa	atcccatgag	300
aagcagcagc	cgcagacagg	agatccttcc	aagagtagct	ccaattccga	tccggtcctc	360
aggcccatgt	gcttcgtgaa	gcagctcgag	gtccctccat	atgggagcta	ccggcccaac	420
gtggccccc	gccacaccca	gggccaactt	ggcaaggagc	tggagaagtt	ctccaaggtc	480
acctttgact	acgcaagttt	cgatgetcag	gtttttggca	aacgcagctt	tgtcccaaaag	540
attcagacca	gcgaaacctc	acctaaagcc	tttcaatcca	aacctttccc	aaaggcctct	600
tccccagggc	acagcccctc	cagtagttat	gtgaggagca	cttcatcctc	ttctgcaggc	660
tttgactact	cgcaggacgc	cgaggctgca	cacatggctg	ccactgccat	cctgaacctc	720
tccacgcgct	gctgggagat	gcctgagaac	ctcagcacga	agccacagga	cctccccagc	780
aagtctgtgg	atatecgaggt	agacgaaaat	ggaaccctgg	acttgagcat	gcacaaacac	840
cgcaaacgag	aaaatgcttt	ccccagcagc	agcagctgca	gcagcagccc	cgggtgtgaag	900
tetcccgacg	cctcccagcg	ccacagcagc	accagcgcgc	ccagcagctc	catgacctct	960
ccccagtgca	gccaggcctc	cgcaggagac	gagtgaggac	ggccccctga	ctacaccaag	1020
cctagccgcc	tgagagagga	ggaacctgag	gagtcagagc	cagcagccca	ttcttttgct	1080
tcttctgaag	cagatgacca	ggaagtgtcg	gaagagaatt	ttgaggagcg	gaagtatccg	1140
ggggaaagta	ccctgaccaa	ctttaagctg	aagtttctct	ccaaggacat	aaagaaggag	1200
ctgctcacct	gtcccacccc	tggctgtgac	ggcagcggcc	acatcacccg	gaactacgcc	1260
tcccacegca	gcctctctgg	ttgcccctct	gtgacaaga	gcctcagaaa	cctcatggct	1320
accactctg	ctgacctgaa	gtgccccacg	cccggctgtg	acggctctgg	ccacatcaca	1380
gggaactacg	cttcacaccc	gagcttgtcc	ggctgcccct	gtgcaaagaa	aagtggagtc	1440
aaggtggcac	ccaccaagga	cgacaaggag	gaccccgagc	tgatgaagtg	cccagttcca	1500
ggctgtgtgg	ggctcgggtc	catcagcggg	aaatacgcct	ctcacaggag	cgcattccgg	1560
tgcccaactg	ccgcccgcag	gcagaaggaa	gggtccctca	atggctcgtc	attctcctgg	1620
aagtccttga	agaatgaaga	cccagacctg	cccaccccg	gctgtgacgg	ctctggccac	1680
accattggga	gtttectcac	ccaccggagt	ttgtcaggct	gtcccagagc	aacctttgct	1740
ggaaagaagg	gaaaactgtc	aggggatgag	gtcctcagtc	caaagttcaa	gactagcgac	1800
gtgttggaga	atgatgagga	gatcaagcag	ctgaaccagg	agatccgaga	cctgaacgag	1860
tccaactcgg	agatggaggg	tgccatgggt	cagctgcagt	cccagatctc	ctccatggag	1920
aagaacctga	agaacatcga	ggaggagaac	aagctcattg	aggagcagaa	tgaagccctg	1980
tttctggagc	tgtccggcct	gagccaggcc	ctcatccaaa	gtctcgccaa	tatccacctt	2040
ccacacatgg	agccaatatg	cgaacagaat	ttcgttccct	atgtgagcac	cctcacccac	2100
atgtactcca	accaggcccc	ggagaacaag	gacctcctgg	agagcatcaa	gcaggctgtg	2160
aggggcatcc	aggtctaggg	cgtgtggtac	ccagaagtgt	cccagcccac	cacaccgttt	2220
acctccctcg	ccctgccccg	caccgtgggg	atgcccaact	cacagtgact	tcccgtttgg	2280
ggcccgggtg	ggcgcgggcg	ggtttatcca	aagggatggc	tggaaaattgg	ccgctcccac	2340
gaggtccct	ccaggcttgg	ccgtggtggc	cctatctgtg	tgcatagggg	cactgaagaa	2400
ttacaaagtg	atttattttt	gtttcttgaa	agaaatctga	agagcagctc	aaagtctcca	2460
gtggaagctc	atggacaagg	ttctcaggga	agttttggag	tttgcaacca	cagtattcct	2520
ttgtctgtcg	aggctgggag	ggtagccgtg	agcgtggtgg	gtgggtgggtg	tgagtggcat	2580
cctggccctg	agtacacgcc	tggggcagcg	tgtctgtgct	cag		2623

<210> 7
<211> 356
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (0)...(0)
<223> Neuro D1 protein; Genbank Accession D82347

<400> 7
Met Thr Lys Ser Tyr Ser Glu Ser Gly Leu Met Gly Glu Pro Gln Pro
1 5 10 15
Gln Gly Pro Pro Ser Trp Thr Asp Glu Cys Leu Ser Ser Gln Asp Glu
20 25 30
Glu His Glu Ala Asp Lys Lys Glu Asp Asp Leu Glu Ala Met Asn Ala
35 40 45
Glu Glu Asp Ser Leu Arg Asn Gly Gly Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu
50 55 60
Asp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Asp Asp Gln Lys
65 70 75 80
Pro Lys Arg Arg Gly Pro Lys Lys Lys Lys Met Thr Lys Ala Arg Leu
85 90 95
Glu Arg Phe Lys Leu Arg Arg Met Lys Ala Asn Ala Arg Glu Arg Asn
100 105 110
Arg Met His Gly Leu Asn Ala Ala Leu Asp Asn Leu Arg Lys Val Val
115 120 125
Pro Cys Tyr Ser Lys Thr Gln Lys Leu Ser Lys Ile Glu Thr Leu Arg
130 135 140
Leu Ala Lys Asn Tyr Ile Trp Ala Leu Ser Glu Ile Leu Arg Ser Gly
145 150 155 160
Lys Ser Pro Asp Leu Val Ser Phe Val Gln Thr Leu Cys Lys Gly Leu
165 170 175
Ser Gln Pro Thr Thr Asn Leu Val Gly Gly Cys Leu Gln Leu Asn Pro
180 185 190
Arg Thr Phe Leu Pro Glu Gln Asn Gln Asp Met Pro Pro His Leu Pro
195 200 205
Thr Ala Ser Ala Ser Phe Pro Val His Pro Tyr Ser Tyr Gln Ser Pro
210 215 220
Gly Leu Pro Ser Pro Pro Tyr Gly Thr Met Asp Ser Ser His Val Phe
225 230 235 240
His Val Lys Pro Pro Pro His Ala Tyr Ser Ala Ala Leu Glu Pro Phe
245 250 255
Phe Glu Ser Pro Leu Thr Asp Cys Thr Ser Pro Ser Phe Asp Gly Pro
260 265 270
Leu Ser Pro Pro Leu Ser Ile Asn Gly Asn Phe Ser Phe Lys His Glu
275 280 285
Pro Ser Ala Glu Phe Glu Lys Asn Tyr Ala Phe Thr Met His Tyr Pro
290 295 300
Ala Ala Thr Leu Ala Gly Ala Gln Ser His Gly Ser Ile Phe Ser Gly
305 310 315 320
Thr Ala Ala Pro Arg Cys Glu Ile Pro Ile Asp Asn Ile Met Ser Phe
325 330 335
Asp Ser His Ser His His Glu Arg Val Met Ser Ala Gln Leu Asn Ala

340
 Ile Phe His Asp
 355
 <210> 8
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (0)...(0)
 <223> Neurogenic basic helix-loop-helix protein (Neurod
 1); Genbank Accession U50822.
 <400> 8
 Met Thr Lys Ser Tyr Ser Glu Ser Gly Leu Met Gly Glu Pro Gln Pro
 1 5 10 15
 Gln Gly Pro Pro Ser Trp Thr Asp Glu Cys Leu Ser Ser Gln Asp Glu
 20 25 30
 Glu His Glu Ala Asp Lys Lys Glu Asp Asp Leu Glu Ala Met Asn Ala
 35 40 45
 Glu Glu Asp Ser Leu Arg Asn Gly Gly Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu
 50 55 60
 Asp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Asp Asp Gln Lys
 65 70 75 80
 Pro Lys Arg Arg Gly Pro Lys Lys Lys Lys Met Thr Lys Ala Arg Leu
 85 90 95
 Glu Arg Phe Lys Leu Arg Arg Met Lys Ala Asn Ala Arg Glu Arg Asn
 100 105 110
 Arg Met His Gly Leu Asn Ala Ala Leu Asp Asn Leu Arg Lys Val Val
 115 120 125
 Pro Cys Tyr Ser Lys Thr Gln Lys Leu Ser Lys Ile Glu Thr Leu Arg
 130 135 140
 Leu Ala Lys Asn Tyr Ile Trp Ala Leu Ser Glu Ile Ser Arg Ser Gly
 145 150 155 160
 Lys Ser Pro Asp Leu Val Ser Phe Val Gln Thr Leu Cys Lys Gly Leu
 165 170 175
 Ser Gln Pro Thr Thr Asn Leu Val Ala Gly Cys Leu Gln Leu Asn Pro
 180 185 190
 Arg Thr Phe Leu Pro Glu Gln Asn Gln Asp Met Pro Pro His Leu Pro
 195 200 205
 Thr Ala Ser Ala Ser Phe Pro Val His Pro Tyr Ser Tyr Gln Ser Pro
 210 215 220
 Gly Leu Pro Ser Pro Pro Tyr Gly Thr Met Asp Ser Ser His Val Phe
 225 230 235 240
 His Val Lys Pro Pro Pro His Ala Tyr Ser Ala Ala Leu Glu Pro Phe
 245 250 255
 Phe Glu Ser Pro Leu Thr Asp Cys Thr Ser Pro Ser Phe Asp Gly Pro
 260 265 270
 Leu Ser Pro Pro Leu Ser Ile Asn Gly Asn Phe Ser Phe Lys His Glu
 275 280 285
 Pro Ser Ala Glu Phe Glu Lys Asn Tyr Ala Phe Thr Met His Tyr Pro
 290 295 300

Ala Ala Thr Leu Ala Gly Ala Gln Ser His Gly Ser Ile Phe Ser Gly
 305 310 315 320
 Thr Ala Ala Pro Arg Cys Glu Ile Pro Ile Asp Asn Ile Met Ser Phe
 325 330 335
 Asp Ser His Ser His His Glu Arg Val Met Ser Ala Gln Leu Asn Ala
 340 345 350
 Ile Phe His Asp
 355

<210> 9
 <211> 382
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (0)...(0)
 <223> Neurogenic basic helix-loop-helix protein (neuro
 D2); Genbank Accession U58681.

<400> 9
 Met Leu Thr Arg Leu Phe Ser Glu Pro Gly Leu Leu Ser Asp Val Pro
 1 5 10 15
 Lys Phe Ala Ser Trp Gly Asp Gly Glu Asp Asp Glu Pro Arg Ser Asp
 20 25 30
 Lys Gly Asp Ala Pro Pro Pro Pro Pro Ala Pro Gly Pro Gly Ala
 35 40 45
 Pro Gly Pro Ala Arg Ala Ala Lys Pro Val Pro Leu Arg Gly Glu Glu
 50 55 60
 Gly Thr Glu Ala Thr Leu Ala Glu Val Lys Glu Glu Gly Glu Leu Gly
 65 70 75 80
 Gly Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gly Leu Asp Glu Ala
 85 90 95
 Glu Gly Glu Arg Pro Lys Lys Arg Gly Pro Lys Lys Arg Lys Met Thr
 100 105 110
 Lys Ala Arg Leu Glu Arg Ser Lys Leu Arg Arg Gln Lys Ala Asn Ala
 115 120 125
 Arg Glu Arg Asn Arg Met His Asp Leu Asn Ala Ala Leu Asp Asn Leu
 130 135 140
 Arg Lys Val Val Pro Cys Tyr Ser Lys Thr Gln Lys Leu Ser Lys Ile
 145 150 155 160
 Glu Thr Leu Arg Leu Ala Lys Asn Tyr Ile Trp Ala Leu Ser Glu Ile
 165 170 175
 Leu Arg Ser Gly Lys Arg Pro Asp Leu Val Ser Tyr Val Gln Thr Leu
 180 185 190
 Cys Lys Gly Leu Ser Gln Pro Thr Asn Leu Val Ala Gly Cys Leu
 195 200 205
 Gln Leu Asn Ser Arg Asn Phe Leu Thr Glu Gln Gly Ala Asp Gly Ala
 210 215 220
 Gly Arg Phe His Gly Ser Gly Gly Pro Phe Ala Met His Pro Tyr Pro
 225 230 235 240
 Tyr Pro Cys Ser Arg Leu Ala Gly Ala Gln Cys Gln Ala Ala Gly Gly
 245 250 255
 Leu Gly Gly Gly Ala Ala His Ala Leu Arg Thr His Gly Tyr Cys Ala

Ala	Tyr	Glu	Thr	Leu	Tyr	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Ser	Pro
		275					280						285		
Asp	Tyr	Asn	Ser	Ser	Glu	Tyr	Glu	Gly	Pro	Leu	Ser	Pro	Pro	Leu	Cys
		290				295					300				
Leu	Asn	Gly	Asn	Phe	Ser	Leu	Lys	Gln	Asp	Ser	Ser	Pro	Asp	His	Glu
305					310					315				320	
Lys	Ser	Tyr	His	Tyr	Ser	Met	His	Tyr	Ser	Ala	Leu	Pro	Gly	Ser	Arg
			325					330					335		
Pro	Thr	Gly	His	Gly	Leu	Val	Phe	Gly	Ser	Ser	Ala	Val	Arg	Gly	Gly
			340					345				350			
Val	His	Ser	Glu	Asn	Leu	Leu	Ser	Tyr	Asp	Met	His	Leu	His	His	Asp
		355				360					365				
Arg	Gly	Pro	Met	Tyr	Glu	Glu	Leu	Asn	Ala	Phe	Phe	His	Asn		
		370				375					380				

<210> 10
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (0)...(0)
 <223> Achaete scute homologous protein (ASH1); Genbank
 Accession L08424.

Met	Glu	Ser	Ser	Ala	Lys	Met	Glu	Ser	Gly	Gly	Ala	Gly	Gln	Gln	Pro
1				5					10				15		
Gln	Pro	Gln	Pro	Gln	Gln	Pro	Phe	Leu	Pro	Pro	Ala	Ala	Cys	Phe	Phe
			20				25					30			
Ala	Thr	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gln
		35				40					45				
Ser	Ala	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
	50				55					60					
Ala	Pro	Gln	Leu	Arg	Pro	Ala	Ala	Asp	Gly	Gln	Pro	Ser	Gly	Gly	Gly
65				70					75				80		
His	Lys	Ser	Ala	Pro	Lys	Gln	Val	Lys	Arg	Gln	Arg	Ser	Ser	Ser	Pro
			85					90				95			
Glu	Leu	Met	Arg	Cys	Lys	Arg	Arg	Leu	Asn	Phe	Ser	Gly	Phe	Gly	Tyr
		100					105					110			
Ser	Leu	Pro	Gln	Gln	Gln	Pro	Ala	Ala	Val	Ala	Arg	Arg	Asn	Glu	Arg
		115				120					125				
Glu	Arg	Asn	Arg	Val	Lys	Leu	Val	Asn	Leu	Gly	Phe	Ala	Thr	Leu	Arg
	130				135					140					
Glu	His	Val	Pro	Asn	Gly	Ala	Ala	Asn	Lys	Lys	Met	Ser	Lys	Val	Glu
145				150					155				160		
Thr	Leu	Arg	Ser	Ala	Val	Glu	Tyr	Ile	Arg	Ala	Leu	Gln	Gln	Leu	Leu
			165				170					175			
Asp	Glu	His	Asp	Ala	Val	Ser	Ala	Ala	Phe	Gln	Ala	Gly	Val	Leu	Ser
		180				185					190				
Pro	Thr	Ile	Ser	Pro	Asn	Tyr	Ser	Asn	Asp	Leu	Asn	Ser	Met	Ala	Gly
		195				200					205				

48

Ser Pro Val Ser Ser Tyr Ser Ser Asp Glu Gly Ser Tyr Asp Pro Leu
 210 215 220
 Ser Pro Glu Glu Gln Glu Leu Leu Asp Phe Thr Asn Trp Phe
 225 230 235

<210> 11
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (0)...(0)
 <223> Zic 1 protein; Genbank Accession D76435.

<400> 11
 Met Leu Leu Asp Ala Gly Pro Gln Tyr Pro Ala Ile Gly Val Thr Thr
 1 5 10 15
 Phe Gly Ala Ser Arg His His Ser Ala Gly Asp Val Ala Glu Arg Asp
 20 25 30
 Val Gly Leu Gly Ile Asn Pro Phe Ala Asp Gly Met Gly Ala Phe Lys
 35 40 45
 Leu Asn Pro Ser Ser His Glu Leu Ala Ser Ala Gly Gln Thr Ala Phe
 50 55 60
 Thr Ser Gln Ala Pro Gly Tyr Ala Ala Ala Ala Leu Gly His His
 65 70 75 80
 His His Pro Gly His Val Gly Ser Tyr Ser Ser Ala Ala Phe Asn Ser
 85 90 95
 Thr Arg Asp Phe Leu Phe Arg Asn Arg Gly Phe Gly Asp Ala Ala Ala
 100 105 110
 Ala Ala Ser Ala Gln His Ser Leu Phe Ala Ala Ser Ala Gly Gly Phe
 115 120 125
 Gly Gly Pro His Gly His Thr Asp Ala Ala Gly His Leu Leu Phe Pro
 130 135 140
 Gly Leu His Glu Gln Ala Ala Gly His Ala Ser Pro Asn Val Val Asn
 145 150 155 160
 Gly Gln Met Arg Leu Gly Phe Ser Gly Asp Met Tyr Pro Arg Pro Glu
 165 170 175
 Gln Tyr Gly Gln Val Thr Ser Pro Arg Ser Glu His Tyr Ala Ala Pro
 180 185 190
 Gln Leu His Gly Tyr Gly Pro Met Asn Val Asn Met Ala Ala His His
 195 200 205
 Gly Ala Gly Ala Phe Phe Arg Tyr Met Arg Gln Pro Ile Lys Gln Glu
 210 215 220
 Leu Ile Cys Lys Trp Ile Glu Pro Glu Gln Leu Ala Asn Pro Lys Lys
 225 230 235 240
 Ser Cys Asn Lys Thr Phe Ser Thr Met His Glu Leu Val Thr His Val
 245 250 255
 Thr Val Glu His Val Gly Gly Pro Glu Gln Ser Asn His Ile Cys Phe
 260 265 270
 Trp Glu Glu Cys Pro Arg Glu Gly Lys Pro Phe Lys Ala Lys Tyr Lys
 275 280 285
 Leu Val Asn His Ile Arg Val His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Pro Cys
 290 295 300

Pro Phe Pro Gly Cys Gly Lys Val Phe Ala Arg Ser Glu Asn Leu Lys
 305 310 315 320
 Ile His Lys Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Lys Cys Glu Phe
 325 330 335
 Glu Gly Cys Asp Arg Arg Phe Ala Asn Ser Ser Asp Arg Lys Lys His
 340 345 350
 Met His Val His Thr Ser Asp Lys Pro Tyr Leu Cys Lys Met Cys Asp
 355 360 365
 Lys Ser Tyr Thr His Pro Ser Ser Val Arg Lys His Met Lys Val His
 370 375 380
 Glu Ser Ser Ser Gln Gly Ser Gln Pro Ser Pro Ala Ala Ser Ser Gly
 385 390 395 400
 Tyr Glu Ser Ser Thr Pro Pro Thr Ile Val Ser Pro Ser Thr Asp Asn
 405 410 415
 Pro Thr Thr Ser Ser Leu Ser Pro Ser Ser Ser Ala Val His His Thr
 420 425 430
 Ala Gly His Ser Ala Leu Ser Ser Asn Phe Asn Glu Trp Tyr Val
 435 440 445

<210> 12
 <211> 725
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (0)...(0)
 <223> Myelin transcription factor 1 (My T1); Genbank
 Accession M96980.

<400> 12
 Arg Lys Ser Tyr Tyr Ser Lys Asp Pro Ser Arg Ala Glu Lys Arg Glu
 1 5 10 15
 Ile Lys Cys Pro Thr Pro Gly Cys Asp Gly Thr Gly His Val Thr Gly
 20 25 30
 Leu Tyr Pro His His Arg Ser Leu Ser Gly Cys Pro His Lys Asp Arg
 35 40 45
 Ile Pro Pro Glu Ile Leu Ala Met His Glu Asn Val Leu Lys Cys Pro
 50 55 60
 Thr Pro Gly Cys Thr Gly Gln Gly His Val Asn Ser Asn Arg Asn Thr
 65 70 75 80
 His Arg Ser Leu Ser Gly Cys Pro Ile Ala Ala Ala Glu Lys Leu Ala
 85 90 95
 Lys Ser His Glu Lys Gln Gln Pro Gln Thr Gly Asp Pro Ser Lys Ser
 100 105 110
 Ser Ser Asn Ser Asp Arg Ile Leu Arg Pro Met Cys Phe Val Lys Gln
 115 120 125
 Leu Glu Val Pro Pro Tyr Gly Ser Tyr Arg Pro Asn Val Ala Pro Arg
 130 135 140
 His Thr Gln Gly Gln Leu Gly Lys Glu Leu Glu Lys Phe Ser Lys Val
 145 150 155 160
 Thr Phe Asp Tyr Ala Ser Phe Asp Ala Gln Val Phe Gly Lys Arg Met
 165 170 175
 Leu Ala Pro Lys Ile Gln Thr Ser Glu Thr Ser Pro Lys Ala Phe Gln

180										185					190				
Ser	Lys	Pro	Phe	Pro	Lys	Ala	Ser	Ser	Pro	Arg	His	Ser	Pro	Ser	Ser				
195										200					205				
Ser	Tyr	Val	Arg	Ser	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Ala	Gly	Phe	Asp	Tyr	Ser				
210										215					220				
Gln	Asp	Ala	Glu	Ala	Ala	His	Met	Ala	Ala	Thr	Ala	Ile	Leu	Asn	Leu				
225										230					235				
Ser	Thr	Arg	Cys	Trp	Glu	Met	Pro	Glu	Asn	Leu	Ser	Thr	Lys	Pro	Gln				
245										250					255				
Asp	Leu	Pro	Ser	Lys	Ser	Val	Asp	Ile	Glu	Val	Asp	Glu	Asn	Gly	Thr				
260										265					270				
Leu	Asp	Leu	Ser	Met	His	Lys	His	Arg	Lys	Arg	Glu	Asn	Ala	Phe	Pro				
275										280					285				
Ser	Ser	Ser	Ser	Cys	Ser	Ser	Ser	Pro	Gly	Val	Lys	Ser	Pro	Asp	Ala				
290										295					300				
Ser	Gln	Arg	His	Ser	Ser	Thr	Ser	Ala	Pro	Ser	Ser	Ser	Met	Thr	Ser				
305										310					315				
Pro	Gln	Ser	Ser	Gln	Ala	Ser	Arg	Gln	Asp	Glu	Trp	Asp	Arg	Pro	Leu				
325										330					335				
Asp	Tyr	Thr	Lys	Pro	Ser	Arg	Leu	Arg	Glu	Glu	Glu	Pro	Glu	Glu	Ser				
340										345					350				
Glu	Pro	Ala	Ala	His	Ser	Phe	Ala	Ser	Ser	Glu	Ala	Asp	Asp	Gln	Glu				
355										360					365				
Val	Ser	Glu	Glu	Asn	Phe	Glu	Glu	Arg	Lys	Tyr	Pro	Gly	Glu	Val	Thr				
370										375					380				
Leu	Thr	Asn	Phe	Lys	Leu	Lys	Phe	Leu	Ser	Lys	Asp	Ile	Lys	Lys	Glu				
385										390					395				
Leu	Leu	Thr	Cys	Pro	Thr	Pro	Gly	Cys	Asp	Gly	Ser	Gly	His	Ile	Thr				
405										410					415				
Gly	Asn	Tyr	Ala	Ser	His	Arg	Ser	Leu	Ser	Gly	Cys	Pro	Leu	Ala	Asp				
420										425					430				
Lys	Ser	Leu	Arg	Asn	Leu	Met	Ala	Thr	His	Ser	Ala	Asp	Leu	Lys	Cys				
435										440					445				
Pro	Thr	Pro	Gly	Cys	Asp	Gly	Ser	Gly	His	Ile	Thr	Gly	Asn	Tyr	Ala				
450										455					460				
Ser	His	Arg	Ser	Leu	Ser	Gly	Cys	Pro	Arg	Ala	Lys	Lys	Ser	Gly	Val				
465										470					475				
Lys	Val	Ala	Pro	Thr	Lys	Asp	Asp	Lys	Glu	Asp	Pro	Glu	Leu	Met	Lys				
485										490					495				
Cys	Pro	Val	Pro	Gly	Cys	Val	Gly	Leu	Gly	His	Ile	Ser	Gly	Lys	Tyr				
500										505					510				
Ala	Ser	His	Arg	Ser	Ala	Ser	Gly	Cys	Pro	Leu	Ala	Ala	Arg	Arg	Gln				
515										520					525				
Lys	Glu	Gly	Ser	Leu	Asn	Gly	Ser	Ser	Phe	Ser	Trp	Lys	Ser	Leu	Lys				
530										535					540				
Asn	Glu	Asp	Pro	Thr	Cys	Pro	Thr	Pro	Gly	Cys	Asp	Gly	Ser	Gly	His				
545										550					555				
Thr	Ile	Gly	Ser	Phe	Leu	Thr	His	Arg	Ser	Leu	Ser	Gly	Cys	Pro	Arg				
565										570					575				
Ala	Thr	Phe	Ala	Gly	Lys	Lys	Gly	Lys	Leu	Ser	Gly	Asp	Glu	Val	Leu				
580										585					590				
Ser	Pro	Lys	Phe	Lys	Thr	Ser	Asp	Val	Leu	Glu	Asn	Asp	Glu	Glu	Ile				
595										600					605				
Lys	Gln	Leu	Asn	Gln	Glu	Ile	Arg	Asp	Leu	Asn	Glu	Ser	Asn	Ser	Glu				

610 615 620
 Met Glu Ala Ala Met Val Gln Leu Gln Ser Gln Ile Ser Ser Met Glu
 625 630 635 640
 Lys Asn Leu Lys Asn Ile Glu Glu Glu Asn Lys Leu Ile Glu Glu Gln
 645 650 655
 Asn Glu Ala Leu Phe Leu Glu Leu Ser Gly Leu Ser Gln Ala Leu Ile
 660 665 670
 Gln Ser Leu Ala Asn Ile His Leu Pro His Met Glu Pro Ile Cys Glu
 675 680 685
 Gln Asn Phe Val Pro Tyr Val Ser Thr Leu Thr Asp Met Tyr Ser Asn
 690 695 700
 Gln Ala Pro Glu Asn Lys Asp Leu Leu Glu Ser Ile Lys Gln Ala Val
 705 710 715 720
 Arg Gly Ile Gln Val
 725

<210> 13
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> gene
 <222> (0)...(0)
 <223> MSX1 antisense oligonucleotide sequence MSX1-1

<400> 13
 gacaccgagt ggcaaagaag tcatgtc

27

<210> 14
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> gene
 <222> (0)...(0)
 <223> MSX1 antisense oligonucleotide sequence MSX1-2

<400> 14
 cggcttcctg tggtcggcca tgag

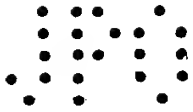
24

<210> 15
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> gene
 <222> (0)...(0)
 <223> HES1 open reading frame 5' sequence (HES1-1)

<400> 15
 accgggggacg aggaattttt ctccattata tcagc

35



特 2 0 0 0 - 0 4 8 2 9 1

<210> 16
<211> 40
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> gene
<222> (0)...(0)
<223> HES1 open reading frame middle sequence (HES1-2)

<400> 16
cacggagggtg ccgctgttgc tgggctggtg tgggtgtagac

40

53

cells or on a morphological or electrophysiological characteristic and/or molecular biological property of said cells. An effect altering cell survival, a morphological or electrophysiological characteristic and/or a molecular biological property of the cells indicates the activity of the chemotherapeutic agent.

5 The present invention is also related to a kit for transdifferentiating an epidermal basal cell into a cell having one or more morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural progenitor, neuronal, or glial cell. The kit is useful for practicing the inventive methods.

10 The present invention is directed to methods of converting, or transdifferentiating, epidermal cells into different types of neural cells having numerous uses in the field of applied neurobiology. In particular, the newly created neurons of the invention can be used in both cell therapies and gene therapies aimed at alleviating neurological disorders and diseases. Further, the invention obviates the need for human fetal tissue as a renewable source of neurons to be used in various medical and research applications.

15 These and other advantages and features of the present invention will be described more fully in a detailed description of the preferred embodiments which follows.

4 Brief Description of Drawings

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1. Transdifferentiation of epidermal basal cells into neuronal cells. Dedifferentiated epidermal basal cells were transfected with NeuroD1+Zic1+MyT1 and simultaneously treated with antisense oligonucleotides corresponding to a portion of MSX1 and HES transcription factors. (A) epidermal basal cells, (B) dedifferentiated epidermal basal cells, (C) newly created neurons, 25% of cells are Neurofilament M immunoreactive 5 days after transfection and treatment with BDNF and all-trans retinoic acid.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS OF THE INVENTION

25 An awareness of the difficulties currently associated with neuronal cell or gene therapy approaches, as these pertain to the use of alternative sources of neuronal cells, especially those used for autologous transplantation, has led to the present invention. The present invention provides methods to convert, or transdifferentiate, epidermal cells into different types of neuronal cells that can be used for intracerebral transplantation. Importantly, the present

2 Claims

CLAIMS

1. A method of transdifferentiating an epidermal basal cell into a cell having one or more morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural progenitor, neuronal, or glial cell, comprising:

5 (a) culturing a proliferating epidermal basal cell population comprising one or more epidermal basal cell(s), said cell(s) derived from the skin of a mammalian subject;

(b) transfecting said epidermal basal cell, in vitro, with one or more eukaryotic expression vector(s) containing at least one cDNA encoding a human neurogenic transcription factor, or homologous non-human counterpart, or active fragment(s) thereof, from the group consisting of
10 NeuroD1, NeuroD2, ASH1, Zic1, Zic3, and MyT1, such that at least one of the neurogenic transcription factor(s) is expressed in said cell;

(c) growing the transfected cell in the presence of at least one antisense oligonucleotide comprising a segment of a human MSX1 gene and/or human HES1 gene, or homologous non-human counterpart of either of these, thereby suppressing at least one negative regulator of neuronal
15 differentiation; and, optionally,

(d) growing said epidermal cell with a retinoid and at least one neurotrophin selected from the group consisting of BDNF, CNTF, PDGF, NGF, NT-3, NT-4, sonic hedgehog, and active fragments of any of these, or a cytokine comprising IL-6, whereby the cell is transdifferentiated into
20 a cell having one or more morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural progenitor, neuronal, or glial cell.

2. The method of Claim 1, wherein the physiological and/or immunological feature is expression of a marker selected from the group consisting of nestin, neural RNA-binding protein Musashi, neurofilament M, neural-specific β -tubulin, neural-specific enolase, microtubule associated protein 2, glial fibrillary acidic protein (GFAP), O4, or a combination of any of these.

25 3. The method of Claim 1, wherein the morphological feature comprises one or more morphological neurite-like process(es) at least about 50 micrometers in length.

4. A transdifferentiated cell having one or more morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural progenitor, neuronal, or glial cell, comprising:
an epidermal basal cell transfected with one or more expression vectors comprising a constitutive
30 eukaryotic promoter sequence operatively linked to a DNA(s) encoding the neurogenic transcription

factor NeuroD1, NeuroD2, ASH1, Zic1, Zic3, or MyT1, wherein the DNA encoding the neurogenic transcription factor is of human origin, or is a non-human homologous counterpart, or is an active fragment of a gene encoding any of these, said cell being treated with at least one antisense oligonucleotide comprising a segment(s) of human MSX1 gene or human HES1 gene, or non-human homologous counterpart thereof, and wherein said cell was grown in the presence of a retinoid and at least one neurotrophin, thereby transdifferentiating said epidermal basal cell into a cell having one or more morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural progenitor, neuronal, or glial cell.

5. The transdifferentiated cell of Claim 4, wherein the physiological and/or immunological feature is expression of a marker selected from the group consisting of nestin, neural RNA-binding protein Musashi, neurofilament M, neural-specific β -tubulin, neural-specific enolase, microtubule associated protein 2, glial fibrillary acidic protein (GFAP), O4, or a combination of any of these.

6. The transdifferentiated cell of Claim 4, wherein the morphological feature comprises one or more morphological neurite-like process(es) at least about 50 micrometers in length.

7. The transdifferentiated cell of Claim 4, wherein the physiological and/or immunological feature expressed by the cell is a marker selected from the group consisting of nestin, neural RNA-binding protein Musashi, neurofilament M, neural-specific β -tubulin, neural-specific enolase, microtubule associated protein 2, glial fibrillary acidic protein (GFAP), O4, or a combination of any of these.

8. The transdifferentiated cell of Claim 4, wherein the morphological feature expressed by the cell is one or more morphological neurite-like process(es) at least about 50 micrometers in length.

9. A cell culture derived from the transdifferentiated cell of Claim 4, comprising a plurality of cells that express one or more morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural progenitor, neuronal, or glial cell.

10. A kit for converting epidermal basal cells to cells into cells having one or more

morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural progenitor, neuronal, or glial cell, said kit comprising:

(A) one or more eukaryotic expression vector(s) containing cDNA encoding a neurogenic transcription factor, or fragment thereof, from the group consisting of NeuroD1, NeuroD2, ASH1, Zic1, Zic3, and MyT1, or a non-human homologous counterpart of any of these;

(B) at least one antisense oligonucleotide corresponding to the human MSX1 gene, the human HES1 gene, or a non-human homologous counterpart of either of these; and

(C) a retinoid and at least one neurotrophin from the group consisting of BDNF, CNTF, PDGF, NGF, NT-3, NT-4, and sonic hedgehog.

10

11. The kit of Claim 10, further comprising instructions for using (A), (B), and (C) in transdifferentiating a mammalian subject's epidermal basal cell(s).

12. A method of using transdifferentiated epidermal basal cells having one or more morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural progenitor, neuronal, or glial cell to isolate a novel nerve growth factor, comprising:

(a) transdifferentiating epidermal basal cells to cells having one or more morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural progenitor, neuronal, or glial cell as in Claim 1;

(b) culturing the transdifferentiated cells in vitro;

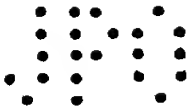
(c) exposing the cultured cells, in vitro, to a potential nerve growth factor; and

(d) detecting the presence or absence of an effect of the potential nerve growth factor on the survival of the cells or on a morphological or electrophysiological characteristic and/or molecular biological property of said cells, whereby an effect altering cell survival, an electrophysiological characteristic and/or a molecular biological property in the cells indicates the action of the novel nerve growth factor.

13. A method of using transdifferentiated epidermal basal cells having one or more morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural progenitor, neuronal, or glial cell to screen a potential new drug for treating a nervous system disorder, comprising:

(a) transdifferentiating epidermal basal cells from a patient with a nervous system disorder

57



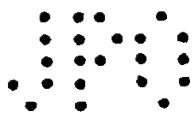
to cells having one or more morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural progenitor, neuronal, or glial cell as in Claim 1;

(b) culturing the transdifferentiated cells in vitro;

(c) exposing the cultured cells, in vitro, to a potential new drug; and

- 5 (d) detecting the presence or absence of an effect of the potential new drug on the survival of the cells or on a morphological or electrophysiological characteristic and/or molecular biological property of said cells, whereby an effect altering cell survival, an electrophysiological characteristic and/or a molecular biological property in the cells indicates the action of the potential new drug factor.

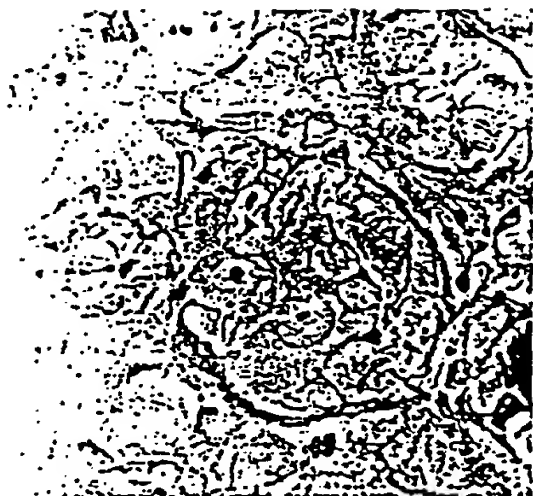
- 10 14. The method of Claim 1, wherein culturing a proliferating epidermal basal cell population comprising one or more epidermal basal cell(s) comprises separating basal cells from keratinocytes using a calcium-free medium.



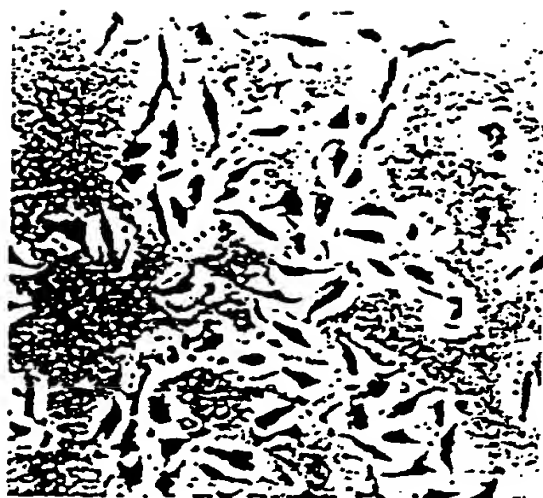
特2000-048291

【書類名】 外国語図面

A



B



C



Figure 1.

【書類名】 外国語要約書

1 Abstract

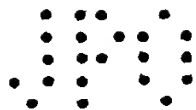
ABSTRACT OF THE DISCLOSURES

Disclosed is a method of transdifferentiating an epidermal basal cell into a cell having one or more morphological, physiological and/or immunological features of a neural progenitor, neuronal, or glial cell by culturing a proliferating epidermal basal cell population derived from the skin of a mammalian subject; transfecting the cells, in vitro, with one or more eukaryotic expression vector(s) that contain at least one cDNA encoding a human neurogenic transcription factor, or homologous non-human counterpart, or active fragment(s) thereof, such as NeuroD1, NeuroD2, ASH1, Zic1, Zic3, or MyT1, such that at least one of the neurogenic transcription factor(s) is expressed in the cell; growing the cells in an in vitro growth medium in which is present at least one antisense oligonucleotide comprising a segment of a human MSX1 gene and/or human HES1 gene, or homologous non-human counterpart of either of these, thereby suppressing at least one negative regulator of neuronal differentiation; and the cell(s) are, optionally, further grown with a retinoid and at least one neurotrophin, such as BDNF, CNTF, PDGF, NGF, NT-3, NT-4, or sonic hedgehog, or a cytokine comprising IL-6. Also disclosed is a transdifferentiated cell of epidermal origin and cell cultures derived therefrom. In addition, methods of using the inventive transdifferentiated cell(s) and cell cultures to identify a novel nerve growth factor or to screen a potential chemotherapeutic agent by detecting the presence or absence of an effect, in vitro, on a morphological, physiological and/or molecular biological property of the transdifferentiated cell(s) are described, as is a method of using the transdifferentiated cell(s) and cell cultures to screen a potential chemotherapeutic agent to treat a nervous system disorder of genetic origin. A kit useful for practicing the methods is disclosed.

13922.1

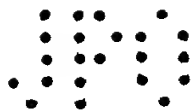
2 Representative Drawing

None



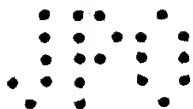
特 2 0 0 0 - 0 4 8 2 9 1

【書類名】 優先権証明書提出書
【提出日】 平成12年 2月15日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
 【出願日】 平成12年 1月20日提出の特許願
 【整理番号】 PA-24323
【提出者】
 【氏名又は名称】 セダーシナイ メディカル センター
【代理人】
 【識別番号】 100066692
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 浅村 皓
【提出物件の目録】
 【物件名】 優先権証明書 1



特 2 0 0 0 - 0 4 8 2 9 1

【書類名】 優先権証明書提出書
【提出日】 平成 1 2 年 2 月 1 5 日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
【出願日】 平成 1 2 年 1 月 2 0 日提出の特許願
【整理番号】 P A - 2 4 3 2 3
【提出者】
【氏名又は名称】 セダーシナイ メディカル センター
【代理人】
【識別番号】 1 0 0 0 6 6 6 9 2
【弁理士】
【氏名又は名称】 浅村 皓
【最初の出願の表示】
【国名】 アメリカ合衆国
【出願日】 1 9 9 9 年 1 月 2 0 日
【出願番号】 2 3 4 3 3 2
【提出物件の目録】
【物件名】 優先権証明書 1



特 2 0 0 0 - 0 4 8 2 9 1

(B)20000320227

優先権証明書訳文（抄訳）

第一国の国名 アメリカ合衆国

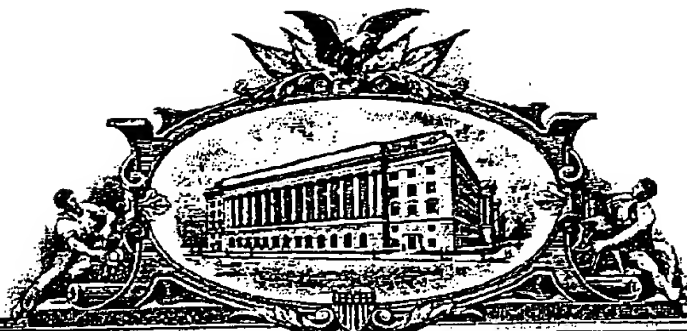
第一国の出願日 1999年1月20日

出願番号 234332

発明の名称 トランスフェクトされた上皮基底細胞の神経原細胞（n
eural progenitor cell）、ニュー
ロン細胞および／またはグリア細胞への分化転換

PA-24323

SA 199510



THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

February 02, 2000

**THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM
THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK
OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT
APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A
FILING DATE UNDER 35 USC 111.**

APPLICATION NUMBER: 09/234,332

FILING DATE: January 20, 1999



**By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS**

P. R. Grant
P. R. GRANT
Certifying Officer

UTILITY APPLICATION

OF

Michel F. Lévesque, M.D.

and

Toomas Neuman, Ph.D.

FOR

UNITED STATES PATENT

ON

CONVERSION OF NON-NEURONAL CELLS INTO NEURONS:
TRANSDIFFERENTIATION OF EPIDERMAL CELLS

Docket No.: P07 41494
Sheets of Drawings: 1

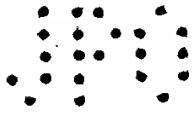
PRETTY, SCHROEDER & POPLAWSKI
444 South Flower Street, Suite 1900
Los Angeles, California 90071
Ofc.: 213/622-7700
Fax: 213/489-4210

CERTIFICATE OF MAILING BY "EXPRESS MAIL"

"EXPRESS MAIL" MAILING LABEL NUMBER EM4487411US
DATE OF DEPOSIT JANUARY 20, 1999

I HEREBY CERTIFY THAT THIS PAPER OR FEE IS BEING DEPOSITED WITH THE UNITED STATES POSTAL SERVICE
"EXPRESS MAIL POST OFFICE TO ADDRESSEE" SERVICE UNDER 37 CFR 1-10 ON THE DATE INDICATED ABOVE AND
IS ADDRESSED TO THE ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS, WASHINGTON, D. C. 20231.

Kimberly Yee
(TYPED OR PRINTED NAME OF PERSON MAILING PAPER OR FEE)
Kimberly Yee
(SIGNATURE OF PERSON MAILING PAPER OR FEE)



特 2000-048291

認定・付加情報

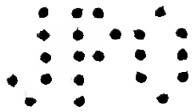
特許出願の番号	特願 2000-048291
受付番号	20000320227
書類名	優先権証明書提出書
担当官	岡田 幸代 1717
作成日	平成12年 3月29日

<認定情報・付加情報>

【提出された物件の記事】

優先権証明書 1

次頁無



特 2 0 0 0 - 0 4 8 2 9 1

【書類名】 翻訳文提出書

【提出日】 平成12年 3月21日

【あて先】 特許庁長官殿

【出願の表示】

【出願番号】 特願2000- 48291

【特許出願人】

【住所又は居所】 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ロス アンジェル
ス ベバリー ブールバード 8 7 0 0 番

【氏名又は名称】 セダーシナイ メディカル センター

【代理人】

【識別番号】 100066692

【弁理士】

【氏名又は名称】 浅村 皓

【確認事項】 本書に添付した翻訳文は、外国語書面出願の願書に添付
して提出した外国語明細書、外国語図面及び外国語要約
書に記載した事項を過不足なく適正な日本語に翻訳した
ものである

【提出物件の目録】

【物件名】 外国語明細書の翻訳文 1

【物件名】 外国語図面の翻訳文 1

【物件名】 外国語要約書の翻訳文 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 トランスフェクトされた上皮基底細胞の神経原細胞 (neural progenitor cell)、ニューロン細胞および／またはグリア細胞への分化転換

【特許請求の範囲】

【請求項1】 表皮基底細胞を、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の、1つまたはそれ以上の形態学的、生理学および／または免疫学的特徴を有する細胞に、分化転換する方法であって、

(a) 哺乳動物被験体の皮膚に由来する1つまたはそれ以上の表皮基底細胞を含む増殖表皮基底細胞集団を培養すること；

(b) NeuroD1 (NeuroD1)、NeuroD2 (NeuroD2)、ASH1、Zic1、Zic3、およびMyT1よりなる群からの、ヒト神経原性転写因子または相同的な非ヒト神経原性転写因子、またはその活性な断片をコードする少なくとも1つのcDNAを含有する1つまたはそれ以上の真核生物発現ベクターにより、該表皮基底細胞をインビトロでトランスフェクションすることにより、該細胞中で少なくとも1つの神経原性転写因子が発現されるようにすること；

(c) ヒトMSX1遺伝子および／またはヒトHES1遺伝子の1つのセグメント、またはこれらのいずれかの相同的な非ヒト対応物を含んでなる、少なくとも1つのアンチセンスオリゴヌクレオチドの存在下で、トランスフェクションした細胞を増殖させ、こうしてニューロン分化の少なくとも1つの負の調節因子を抑制すること；および、場合により

(d) レチノイド、およびBDNF、CNTF、PDGF、NGF、NT-3、NT-4、ソニックヘッジホッグ (sonic hedgehog)、およびこれらのいずれかの活性な断片よりなる群から選択される少なくとも1つのニューロトロフィン、またはIL-6を含むサイトカインと一緒に該表皮細胞を増殖させ、こうして細胞を、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の1つまたはそれ以上の形態学的、生理学および／または免疫学的特徴を有する細胞に分化転換すること



を含んでなる、上記方法。

【請求項2】 生理学のおよび／または免疫学的特徴は、ネスティン (nestin)、神経RNA結合タンパク質ムサシ (Musashi)、ニューロフィラメントM、神経特異的 β -チューブリン、神経特異的エノラーゼ、微小管結合タンパク質2、神経膠線維酸性タンパク質 (GFAP)、O4、またはこれらのいずれかの組合せよりなる群から選択されるマーカーの発現である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 形態学的特徴は、長さが少なくとも約50マイクロメートルの1つまたはそれ以上の形態学的な軸索突起様突起を含んでなる、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 1つまたはそれ以上の神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の形態学的、生理学のおよび／または免疫学的特徴を有する分化転換した細胞であって、

神経原性転写因子NeuroD1、NeuroD2、ASH1、Zic1、Zic3、またはMyT1をコードするDNAに機能的に結合した構成性真核生物プロモーター配列を含んでなる1つまたはそれ以上の発現ベクターでトランスフェクションした表皮基底細胞であり、該神経原性転写因子をコードするDNAは、ヒト由来のDNAであるか、または相同的な非ヒト対応物であるか、またはこれらのいずれかをコードする遺伝子の活性な断片であり、該細胞は、ヒトMSX1遺伝子またはヒトHES1遺伝子のセグメント、または相同的なその非ヒト対応物を含んでなる少なくとも1つのアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理され、そして該細胞は、レチノイドと少なくとも1つのニューロトロフィンの存在下で増殖させ、こうして該表皮基底細胞を、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の1つまたはそれ以上の形態学的、生理学のおよび／または免疫学的特徴を有する細胞に分化転換する該表皮基底細胞を含んでなる、上記細胞。

【請求項5】 生理学のおよび／または免疫学的特徴は、ネスティン (nestin)、神経RNA結合タンパク質ムサシ (Musashi)、ニューロフィラメントM、神経特異的 β -チューブリン、神経特異的エノラーゼ、微小管結

合タンパク質2、神経膠線維酸性タンパク質（GFAP）、O4、またはこれらのいずれかの組合せよりなる群から選択されるマーカーの発現である、請求項4に記載の分化転換した細胞。

【請求項6】 形態学的特徴は、長さが少なくとも約50マイクロメートルの1つまたはそれ以上の形態学的な軸索突起様突起を含んでなる、請求項4に記載の分化転換した細胞。

【請求項7】 細胞により発現される生理学のおよび／または免疫学的特徴は、ネスティン（nestin）、神経RNA結合タンパク質ムサシ（Musashi）、ニューロフィラメントM、神経特異的β-チューブリン、神経特異的エノラーゼ、微小管結合タンパク質2、神経膠線維酸性タンパク質（GFAP）、O4、またはこれらのいずれかの組合せよりなる群から選択されるマーカーである、請求項4に記載の分化転換した細胞。

【請求項8】 細胞により発現される形態学的特徴は、長さが少なくとも約50マイクロメートルの1つまたはそれ以上の形態学的な軸索突起様突起である、請求項4に記載の分化転換した細胞。

【請求項9】 神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の1つまたはそれ以上の形態学的、生理学のおよび／または免疫学的特徴を発現する多数の細胞を含んでなる、請求項4に記載の分化転換した細胞に由来する細胞培養物。

【請求項10】 表皮基底細胞を、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の1つまたはそれ以上の形態学的、生理学のおよび／または免疫学的特徴を有する細胞に変換するキットであって、

(A) NeuroD1、NeuroD2、ASH1、Zic1、Zic3、およびMyT1よりなる群からの、神経原性転写因子、またはその断片、またはこれらのいずれかの相同的な非ヒト対応物をコードするcDNAを含有する1つまたはそれ以上の真核生物発現ベクター；

(B) ヒトMSX1遺伝子、ヒトHES1遺伝子、またはこれらのいずれかの相同的な非ヒト対応物に相当する少なくとも1つのアンチセンスオリゴヌクレオチド；および

(C) レチノイドおよびBDNF、CNTF、PDGF、NGF、NT-3、NT-4、およびソニックヘッジホッグ (sonic hedgehog) よりなる群からの少なくとも1つのニューロトロフィンを含んでなる、上記キット。

【請求項11】 被験体の表皮基底細胞を分化転換する際の(A)、(B)、および(C)の使用説明書をさらに含んでなる、請求項10に記載のキット。

【請求項12】 新規な神経成長因子を単離するための、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の1つまたはそれ以上の形態学的、生理学および/または免疫学的特徴を有する分化転換した表皮基底細胞の使用方法であって、

(a) 請求項1に記載のように表皮基底細胞を、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の1つまたはそれ以上の形態学的、生理学および/または免疫学的特徴を有する細胞に分化転換すること；

(b) 分化転換した細胞をインビトロで培養すること；

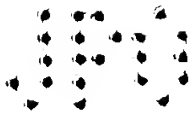
(c) 可能性ある神経成長因子にインビトロで培養細胞を暴露すること；および

(d) 細胞の生存、または該細胞の形態学的または電気生理学的特性および/または分子生物学的性質に及ぼす、可能性ある神経成長因子の作用の存在または非存在を検出し、それによって、細胞の生存、細胞における電気生理学的特性および/または分子生物学的性質を変化させる作用は、新規な神経成長因子の作用を示すこと

を含んでなる、上記方法。

【請求項13】 神経系障害を治療するための新しい薬物候補をスクリーニングするための、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の1つまたはそれ以上の形態学的、生理学および/または免疫学的特徴を有する分化転換した表皮基底細胞の使用方法であって、

(a) 請求項1に記載のように、神経系障害の患者からの表皮基底細胞を、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の1つまたはそれ以上の形態学的、生理学および/または免疫学的特徴を有する細胞に分化転換すること；



- (b) 分化転換した細胞をインビトロで培養すること；
 - (c) 新しい薬物候補にインビトロで培養細胞を暴露すること；および
 - (d) 細胞の生存、または該細胞の形態学的または電気生理学的特性および／または分子生物学的性質に及ぼす、新しい薬物候補の作用の存在または非存在を検出し、それによって、細胞の生存、細胞における電気生理学的特性および／または分子生物学的性質を変化させる作用は、新しい薬物候補因子の作用を示すこと
- を含んでなる、上記方法。

【請求項 1 4】 1 つまたはそれ以上の表皮基底細胞を含む増殖表皮基底細胞集団の培養は、無カルシウム培地を使用する角化細胞からの基底細胞の分離を含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

(発明の背景)

本出願を通して種々の刊行物がカッコ内に参照される。これらの刊行物の開示内容は、本発明が関係する技術の現状をさらに十分に記載するために、その全体が参照により本出願に組み込まれる。

【0 0 0 2】

【産業上の利用分野】

本発明は、医療、特に神経組織再生の分野に関する。

【0 0 0 3】

【従来の技術】

ヒト神経系は、相互に特異的な連絡を作る非常に多様な型の細胞を含む。神経系は、末梢神経および中枢神経系を含む。中枢神経系は、脳、脳神経、および脊髄を含む。一旦損傷すると、成人の中枢神経系では、構造的自己修復の可能性が限定されている。成人では一般に新しいニューロン（身体的一部分から別の部分への電気シグナルの伝達のために分化した興奮性細胞）を生成することが不可能であることが、典型的には神経組織の再生を妨げている。この限界は、例えば卒中または物理的外傷からの神経学的創傷、またはハンチントン病、アルツハイマ

ー病、およびパーキンソン病のような変性疾患の治療法の開発を妨げてきた。パーキンソン病の胎児性組織移植の適度な成功は、細胞置換療法が神経学的創傷および変性の有用な治療法でありうることを示唆している。

【0004】

すなわち、細胞置換療法のアプローチにおいて、ニューロン細胞の直接転移を紹介する種々の神経学的外傷、疾患、障害、または疾病の治療において使用するためのニューロンの生成方法に対する、長年のニーズが存在する。

【0005】

一方、遺伝子治療は、他の型の神経系障害を治療するために必要とされる。脳は、脳内への大きな分子の流動を有効に阻止する血液脳関門により保護されているため、成長因子薬物、または他の治療薬候補の遺伝子産物の末梢への注射は無効である。すなわち、バイオテクノロジー工業が直面する大きな課題は、遺伝子治療産物を脳に直接送達するための効率的機構を発見することにより、分子レベルで神経学的障害を治療することである。この点に関して、ヒト神経細胞の再生可能な供給源は、脳および中枢神経系の残りの部分に遺伝子治療産物を送達するための輸送手段となりうる。

【0006】

最近まで、これらの有望な治療用のドナー物質の唯一の供給源は、胎児組織であった。しかし胎児組織の使用は、胎児組織の利用が限定されていること、レシピエントによるドナー物質の免疫拒絶の可能性、およびドナー物質による病気の感染のリスクを含む、大きな倫理的および技術的問題を投げかけている。

【0007】

神経前駆細胞または神経幹細胞の培養により、ドナー物質の不足に取り組む幾つかの試みが行われてきた。例えば、ボス (B o s s) らは、増殖したドナー細胞の成長、貯蔵、産生および移植に向けた神経前駆細胞の単離および増殖のための方法を教示した。(ボス (B o s s) ら、「増殖したニューロン前駆細胞産物およびプロセス」、米国特許第5, 411, 883号)。アンダーソン (A n d e r s o n) らは、自己再生および神経細胞または神経膠細胞への分化が可能な、ドナー哺乳動物神経冠幹細胞の単離およびクローン性増殖のための方法を教示

した。(アンダーソン (Anderson) ら、「哺乳動物神経冠幹細胞」、米国特許第5, 589, 376号)。ジョー (Johé) は、胚および成体哺乳動物ドナーの中樞神経系からの幹細胞の単離、増殖および指向性分化のための方法を教示した。(ジョー (Johé)、「哺乳動物の胚および成体中樞神経系からの幹細胞の単離、増殖および指向性分化」、米国特許第5, 753, 506号)。

【0008】

神経前駆細胞は通常、胚体外胚葉組織から発生する。骨形成タンパク質 (Bone Morphogenetic Protein) (BMP) は、外胚葉が、そのデフォルト状態の神経組織に発生するのを妨げ、かつ表皮組織の代わりにその発生を誘導するリプレッサーのファミリーである。(ワイ・タナベ (Y. Tanabe) とティー・エム・ジェッセル (T. M. Jessell)、「脊髄の発生における多様性とパターン」、Science 274:1115 [1996]；ワイ・ササイ (Y. Sasai)、「失われた環の同定：脊椎動物の胚におけるニューロン誘導と一次神経発生を結びつける遺伝子」、Neuron 21:455-58 [1998]；ワイ・フルタ (Y. Furuta) ら、「背側前脳発生の調節物質としての骨形成タンパク質 (BMPs)」、Development 124 (11):2203-2212 [1997])。BMP2およびBMP4は、表皮分化を誘導する。(イー・ペラ (E. Pera) ら、「鳥類胚における外胚葉パターン化：表皮対神経板」、Development 126:63 [1999])。

【0009】

BMPはまた、軟骨形成をも誘導する。ハタースリー (Hattersley) らは、マウス肢芽に由来する細胞株にBMP13を添加すると、軟骨芽細胞様細胞の形成が起こることを証明し、そして先天性または外傷誘導性損傷の部位に関節軟骨形成を誘導するためのBMP13の使用法、および軟骨を維持するためのBMP9の使用法を教示した。(ハタースリー (Hattersley) ら、「骨形成タンパク質による軟骨誘導」、米国特許第5, 902, 785号)。

【0010】

BMPシグナル伝達は、表皮誘導およびニューロン分化の阻害に関係する前初期応答遺伝子である *msx1* により媒介されるようである。スズキ (Suzuki) らは、BMP RNA をアフリカツメガエル胚に注射したとき、彼らは *msx1* RNA 産生を検出した；彼らが *msx1* RNA を注射したとき、胚は眼のようなニューロン構造を失った。(スズキ (Suzuki) ら、「アフリカツメガエル *msx1* は BMP 4 による表皮誘導および神経阻害を媒介する」、*Development* 124:3037 [1997])。解離性外胚葉細胞に *msx1* を直接加えると、表皮発生はアップレギュレーションされ、そして神経発生はダウンレギュレーションされた。ヒトでは同様に、BMP 成長因子は、外胚葉細胞におけるホメオドメイン転写因子 *MSX1* の発現を誘導する。一旦 *MSX1* が発現されると、ニューロン決定遺伝子の誘導は同時に抑制され、ニューロン分化は阻害される。

【0011】

BMP は、少なくとも 2 つの機作 (*MASH1* タンパク質の蛋白質分解と *Zic3* 産生の阻害) により神経発生をダウンレギュレーションするようである。神経前駆細胞の BMP への暴露は、ショウジョウバエ (*Drosophila*) のアカエテースクート (*Achaete-Scute*) 複合体 (*ASH1*) に相同であり、かつ嗅覚受容体ニューロンの産生に必要な転写因子である *MASH1* タンパク質の急速な消失を誘発した。(ショウ (Shou) ら、「BMP は、転写因子の分解を伴う機作により神経発生を阻害する」、*Nat. Neurosci.* 2:339 [1999])。BMP のインヒビターである優性の陰性型の BMP 受容体の、アフリカツメガエル胚へのマイクロインジェクションは、神経発生を増大させるタンパク質である *Zic3* の産生を誘導した。(ナカタ (Nakata) ら、「神経および神経冠発生の両方における主たる調節物質であるアフリカツメガエル *Zic3*」、*Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:11980 [1997])。

【0012】

BMPシグナル伝達活性のアンタゴニストは、ヒトの $\alpha 2$ -HS 糖タンパク質

としても知られているフェチュイン (fetuin) 糖タンパク質、および BMP アンタゴニストの DAN ファミリー (例えば、ノグギン (noggin)、コルディン (chordin)、フォリスタチン、およびグレムリン (gremlin)) を含む。(アール・メリノ (R. Merino) ら、「BMP アンタゴニストのグレムリン (Gremlin) は、発育肢における増生、軟骨形成およびプログラム細胞死を調節する」、Development 126 (23) : 5515-22 [1999] ; ディー・セラードンネンフェルド (D. Selander-Donnenfeld) とシー・カルケイム (C. Kalcheim)、「背側神経管における BMP 4 とノグギン (noggin) の統合活性による神経冠遊走の発現の調節」、Development 126 (21) : 4749-62 [1999])。例えば、デメトリオウ (Demetriou) らは、フェチュインが、ラット骨髄細胞の培養物において、BMP により促進される機能である骨形成を阻止すること、およびフェチュイン由来ペプチドが、BMP 2 に結合することを証明した。(エム・デメトリオウ (M. Demetriou) ら、「フェチュイン/アルファ2-HS 糖タンパク質はトランスホーミング増殖因子-ベータII型受容体ミミックおよびサイトカインアンタゴニストである」、J. Biol. Chem. 271 : 12755-61 [1996])。胚発生および早期生後発育の間に、フェチュインは、網膜神経節細胞層、神経芽細胞層における細胞のサブ集団、および発育小脳の一部に存在することが証明された。(キッチェナー (Kitchenner) ら、「ラットの胎児および生後発育中の網膜と小脳のニューロンにおけるフェチュイン」、Int. J. Dev. Neurosci. 17 : 21 [1999])。

【0013】

フェチュインは、無血清培地における添加物として使用されてきた。ハム (Ham) らは、筋肉変性疾患に罹患した患者の筋肉への移植を目的とする正常ヒト筋衛星細胞の増殖用の無血清培地における、添加物としてのフェチュインの使用を教示した。(ハム (Ham) ら、「正常ヒト筋衛星細胞用の培地」、米国特許第5, 143, 842号; ハム (Ham) ら、「正常ヒト筋衛星細胞用の培地」、米国特許第5, 324, 656号)。ベーカー (Baker) は、広範囲の細

胞懸濁液および単層を増殖させることができる規定無血清培地における、添加物としてのフェチュインの使用を教示した。(ベーカー (Baker)、「無血清細胞培養培地およびこれらを調製するためのプロセス」、米国特許第4,560,655号)。

【0014】

BMP以外の他の因子は、神経分化の調節に関与するようである。イシバシ (Ishibashi) らは、スプリット ホモローグ-1のヘアリーおよびエンハンサー (Hairy and Enhancer of Split Homolog-1) (HES1) の永続的発現が、ニューロンおよび神経膠の分化を激しく混乱させることを証明した。彼らは、胚マウスの脳の側脳室を、HES1を産生するレトロウイルスで感染させた。これによって、感染させた発生細胞における遊走および分化は起きなかった。(イシバシ (Ishibashi) ら、「らせんループ-らせん (Helix-Loop-Helix) 因子HES-1の永続的発現は、中枢神経系における哺乳動物神経分化を妨げる」、The EMBO Journal 13:1799 [1994])。イシバシ (Ishibashi) らはまた、マウスのHES1遺伝子を破壊して、通常よりも早い神経発生を観察した。彼らは、HES1が、神経発生のタイミングを制御すると結論した。(イシバシ (Ishibashi) ら、「哺乳動物スプリット ホモローグ-1のヘアリーおよびエンハンサー (Hairy and Enhancer of Split Homolog-1) (HES1) の標的化破壊は神経らせんループ-らせん因子のアップレギュレーション、早発の神経発生、および重篤な神経管の欠損をもたらす」、Genes & Development 9:3136 [1995])。さらにレチノイン酸のようなレチノイドは、幾つかの神経細胞集団の分化を誘導する役割を担うことがある。(例えば、ワイ・レノンコート (Y. Renoncourt) ら、「ES細胞からインビトロで誘導したニューロンは、運動ニューロンおよび介在ニューロンに特有なホメオタンパク質を発現する」、Mechanisms of Development 79:185-97 [1998])。

【0015】

すなわち、ニューロン組織の分化は、多くの正および負の調節分子の相互作用を伴う。各細胞内の発生シグナルおよびその周囲の微環境に応じて、あらゆるニューロン集団は、特定のセットの神経マーカー、神経伝達物質、および受容体を発現する。神経前駆細胞は、微環境における生理学的シグナルに応じて他の型のニューロン細胞に分化するため、発現されるセットは異なってくる。（例えば、ディー・エル・ステンプル（D. L. Stemple）とエヌ・ケー・マハントッパ（N. K. Mahanthappa）、「神経幹細胞は噴射している」、*Neuron* 18:1-4 [1997]；ワイ・レノンコート（Y. Renoncourt）ら、「ES細胞からインビトロで誘導したニューロンは、運動ニューロンおよび介在ニューロンに特有なホメオタンパク質を発現する」、*Mechanisms of Development* 79:185-97 [1998]；エイ・ジェイ・カルヤニ（A. J. Kalyani）ら、「脊髄ニューロン前駆細胞は培養で多数のニューロン表現型を発生させる」、*J. Neurosci.* 18(19):7856-68 [1998]）。各型のニューロン細胞は、形態（例えば、長い突起または軸索突起）、1セットの神経特異的マーカー（例えば、ニューロフィラメントM、神経特異的チューブリン、神経特異的エノラーゼ、微小管結合タンパク質2、など）の発現、神経伝達物質（例えば、ドーパミン、またはドーパミン合成における重要な酵素であるチロシンヒドロキシラーゼの発現）の合成、および膜興奮性を含む、幾つかの基準により特徴づけられる。

【0016】

【発明が解決しようとするとする課題】

現代の神経生物学の中心的原則の1つは、分化後、全ての型のニューロン細胞ではないとしても主要な投射ニューロンの各々は、それらの標的ニューロン細胞に到達するために、その生存に特異的なサイトカイン、すなわち神経栄養性または神経成長因子を必要とする。多くの疾患におけるニューロパシー（neuropathy）は、そのような神経成長因子により引き起こされるか、またはそれらの欠乏を伴う。これらの神経成長因子は、次世代の神経系障害の予防薬および治療薬である。これまで神経系において知られている成長因子の多くは、末梢神経に及ぼすこれらの作用により発見されたが、これらは、脳内に存在する成長因

子の非常にマイナーな部分である可能性が高い。主として、特定の型のニューロン細胞は脳から単離し、かつ規定培養条件で維持するのが困難であるため、脳からの成長因子の検索は困難であった。

【0017】

この限界のため、中枢神経系を指向した伝統的薬理学による薬物の発見は、全脳ホモジェネートや動物を使用して行われた。これらの研究によって主に、広い作用と副作用を伴う神経伝達物質の類似体が生成された。しかし脳からより多くの神経伝達物質受容体とシグナル伝達タンパク質が同定されるにつれ、1つの神経伝達物質が1つの受容体を活性化するというドグマは、単純化しすぎであることが明らかになってきている。ニューロン中のほとんどの受容体複合体は、幾つかの遺伝子によりコードされるタンパク質サブユニットからなっており、各遺伝子は、多くの異なる変種タンパク質を合成する。これらの変種によって、広範な可能な受容体の組合せが生じるのであって、ある神経伝達物質と相互作用できる単一の受容体が生じるわけではない。その結果、ある範囲のシグナル出力が、単一の神経伝達物質の作用により産生される。そして神経伝達物質によるニューロンに及ぼす特異的シグナルは、どの受容体複合体がその細胞により産生されるかに依存する。すなわち、細胞の多様性は、分子の多様性に一致し、かつ脳機能の複雑さの基になる主要構造要素を構成し、そして薬物スクリーニング目的で培養することができる種々の型のニューロン細胞の供給源が必要とされる。

【0018】

【課題を解決するための手段】

従って、神経学的研究および応用神経生物学の分野には、研究、細胞治療、または遺伝子治療において使用するための、神経前駆細胞、およびニューロン細胞または神経膠型細胞に特異的に関連する特徴を有する細胞の再生可能な非胎児性供給源に対するニーズが残っている。重要なことに、そのような細胞の使用によって、神経系細胞の脳内移植による神経学的機能の回復を目的とする治療的アプローチにおいて、ヒト胎児組織に対するニーズを排除することができた。本発明のこれらおよび他の利点を、以下に記述する。

【0019】

(発明の要約)

本発明は、表皮基底細胞を、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の、1つまたはそれ以上の形態学的、生理学のおよび／または免疫学的特徴を有する細胞に、分化転換する方法に関する。本方法は、哺乳動物被験体の皮膚に由来する1つまたはそれ以上の表皮基底細胞を含む増殖表皮基底細胞集団の培養を伴う。これらの表皮基底細胞は、ヒト神経原性転写因子、または相同的な非ヒト対応物、またはその活性断片（例えば、NeuroD1、NeuroD2、ASH1、Zic1、Zic3、またはMyT1）をコードする少なくとも1つのcDNAを含有する1つまたはそれ以上の真核生物発現ベクターで、インビトロでトランスフェクションすることにより、少なくとも1つの神経原性転写因子が、細胞内で発現されるようにする。トランスフェクションした細胞は、ヒトMSX1遺伝子および／またはヒトHES1遺伝子のセグメント、またはこれらのいずれかの相同的な非ヒト対応物を含んでなる少なくとも1つのアンチセンスオリゴヌクレオチドが存在するインビトロ増殖培地中で増殖させ、こうして少なくとも1つのニューロン分化の負の調節物質を抑制し；そして細胞は、場合によりレチノイドおよび少なくとも1つのニューロトロフィン（例えば、BDNF、CNTF、PDGF、NGF、NT-3、NT-4、またはソニックヘッジホッグ（sonic hedgehog））、またはIL-6を含むサイトカインと一緒にさらに増殖させる。本発明の方法により、細胞は、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の、1つまたはそれ以上の形態学的、生理学のおよび／または免疫学的特徴を有する細胞に分化転換する。

【0020】

本発明はまた、表皮起源の分化転換した細胞に関する。本発明の分化転換した細胞は、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の、1つまたはそれ以上の形態学的、生理学のおよび／または免疫学的特徴を示す表皮基底細胞起源の細胞である。生理学のおよび／または免疫学的特徴は、特に問わないが、それによって分化転換した細胞が、神経前駆細胞、ニューロン細胞もしくはニューロン様細胞、または神経膠細胞もしくは神経膠様細胞として認識される、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞に特異的な1つまたはそれ以上のマ-

カーの発現であってよい。

【0021】

本発明はまた、本発明の分化転換した細胞に由来する細胞培養物に関する。

【0022】

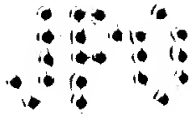
本発明はまた、その分化転換の前または後に、前もって選択された分泌性調節因子またはその生化学的前駆体をコードするDNA、またはこれらのいずれかの合成を触媒する酵素をコードするDNAを含んでなる発現ベクターにより遺伝子的に修飾された、本発明の分化転換した細胞を使用して局所的に分泌性調節因子を送達する方法に関する。遺伝子的に修飾した、分化転換した細胞は、哺乳動物被験体中に移植され、そして移植細胞は、局所的に分泌性調節因子を分泌する。

【0023】

本発明はまた、新規な神経成長因子または可能性ある化学療法剤を同定するために本発明の分化転換細胞を使用する方法に関する。本方法は、増殖表皮基底細胞の集団を、ニューロン前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞に、分化転換すること；分化転換した細胞を培養すること；可能性ある神経成長因子（すなわち、ニューロトロフィンまたは神経栄養因子）および／または可能性ある化学療法剤に培養細胞をインビトロで暴露すること；および細胞の生存または細胞の形態学的または電気生理学的特性および／または分子生物学的性質に及ぼす、可能性ある神経成長因子および／または可能性ある化学療法剤の作用の存在または非存在を検出することを伴う。細胞の生存、細胞の形態学的または電気生理学的特性および／または分子生物学的性質を変化させる作用が存在することは、可能性ある神経成長因子および／または可能性ある化学療法剤の活性を示す。

【0024】

本発明はまた、遺伝子起源の神経系障害を治療するための可能性ある化学療法剤をスクリーニングするために、本発明の分化転換した細胞を使用する方法に関する。本方法では表皮基底細胞は、遺伝子起源の特定の神経系障害を有するヒト被験体由来する。この細胞は、本発明の方法により分化転換される。分化転換した細胞は、培養し、インビトロで可能性ある化学療法剤に暴露する。本方法は、細胞の生存または該細胞の形態学的または電気生理学的特性および／または分



子生物学的性質に及ぼす、可能性ある化学療法剤の作用の存在または非存在を検出することを伴う。細胞の生存、細胞の形態学的または電気生理学的特性および／または分子生物学的性質を変化させる作用は、化学療法剤の活性を示す。

【 0 0 2 5 】

本発明はまた、表皮基底細胞を、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の、1つまたはそれ以上の形態学的、生理学的および／または免疫学的特徴を有する細胞に分化転換するためのキットに関する。このキットは、本発明の方法を実施するのに有用である。

【 0 0 2 6 】

本発明は、表皮細胞を、応用神経生物学の分野において多くの用途を有する異なる型の神経細胞に、変換または分化転換する方法に関する。詳細には、新しく創り出した本発明のニューロンは、神経学的障害および疾患を緩和することを目的とした細胞治療および遺伝子治療の両方において使用することができる。さらに、本発明は、種々の医療および研究応用において使用されるニューロンの再生可能な供給源としてのヒト胎児組織の必要性をなくする。

【 0 0 2 7 】

【発明の効果】

本発明のこれらの利点や他の利点および特徴は、以下の好適な実施態様の詳細な説明において十分に記述される。

【 0 0 2 8 】

(本発明の好ましい態様の詳細な説明)

ニューロン細胞または遺伝子治療のアプローチに現在関連している困難さが認識され、これが、ニューロン細胞、特に自家移植に使用される細胞の代替供給源の使用に関係しているため、これが本発明を導いた。本発明は、表皮細胞を、大脳内移植に使用することができる異なる型のニューロン細胞に変換または分化転換する方法を提供する。重要なことに、本発明はまた、新しく創り出したニューロンの遺伝子操作を可能にする。

【 0 0 2 9 】

本発明の重要な側面は、これが、インビトロ増殖および分化転換後に移植する

ことができる異なる型のニューロン細胞を発生させるために、患者自身の細胞の使用を可能にすることである。すなわち、この技術により、非宿主細胞の移植に伴う問題（例えば、免疫拒絶および感染性疾患のリスク）が排除される。

【0030】

本発明を使用して個々の患者からニューロンを生成し、こうして神経外傷、卒中、神経変性疾患（例えば、パーキンソン病、ハンチントン病、アルツハイマー病）を含む多くの神経学的症状のための治療様式として自家移植を可能にする。すなわち、本発明は、目的の疾患または外傷を治療するための神経学的治療を提供する。

【0031】

要約すると、この技術は、1) 宿主ニューロンの消失を補償するため、または2) 遺伝子に基づく薬物を送達するための輸送手段として、ニューロンの移植を必要とする臨床的治療のためのニューロンの豊富な供給源を提供する。さらに、本発明は、基礎研究および薬物スクリーニングにおいて使用するための新規な神経学的手段を提供する。

【0032】

本発明の分子的な理論的基礎は、後成シグナル伝達および特異的転写因子系の活性化を含む、多くの分子プロセスのニューロン発生における組織化された作用を利用する。発生の間、外胚葉細胞は、周囲細胞から受けるシグナルに応じてニューロン組織または表皮に発展する。この早期発生段階で、成長因子の骨形成タンパク質ファミリー（BMP）の種々のメンバーの活性化によって表皮分化が生じ、一方これらの作用の遮断によってニューロン分化が生じる。（総説としてタナベ（Tanabe）とジェッセル（Jessel）、1996を参照のこと）。この分化経路は、外胚葉細胞内のホメオドメイン転写因子MSX1の発現を誘導するBMP成長因子の作用に基づく。一旦MSX1が発現されると、ニューロン決定遺伝子の誘導は同時に抑制され、ニューロン分化は阻害される。（スズキ（Suzuki）ら、1997）。

【0033】

あるいは、レチノイン酸とソニックヘッジホッグ（Sonic Hedgeh

og) (Shh) シグナル伝達は、その活性がニューロン分化に必須である幾つかのニューロン決定遺伝子および分化遺伝子の発現の誘導を担当する。(総説についてはタナベ(Tanabe)とジェッセル(Jessel)、1996を参照のこと)。詳細には、データは、幾つかの神経原性塩基性らせんループらせん(Helix-Loop-Helix) (bHLH) およびジンクフィンガー転写因子の過剰発現によって、非決定外胚葉からニューロン組織への変換が生じることを証明している。さらには、bHLH転写因子、NeuroD1、NeuroD2 (リー, ジェイ・イー(Lee, J. E.)、ホレンバーグ, エス・エム(Hollenberg, S. M.)、スナイダー, エル(Snyder, L.)、ターナー, ディー・エル(Turner, D. L.)、リップニック, エヌ(Lipnick, N.) およびヴァイントラウプ, エイチ(Weintraub, H.)、(1995)、「NeuroD、塩基性らせんループらせんタンパク質によるアフリカツメガエル外胚葉からニューロンへの変換」、Science 268, 836-844; マコーミック, エム・ビー(McCormick, M. B.)、タミミ, アール・エム(Tamimi, R. M.)、スナイダー, エル(Snyder, L.)、アサクラ, エイ(Asakura, A.)、バーグストロム, ディー(Bergstrom, D.) およびタップスコット, エス・ジェイ(Tapscott, S. J.)、(1996)、「NeuroD2およびNeuroD3: NeuroD遺伝子ファミリー内の独特な発現パターンおよび転写活性化ポテンシャル」、Mol. Cell. Biol. 16, 5792-5800)、またはニューロゲニン1(neurogenin 1) (マー, キュー(Ma, Q.)、キントナー, シー(Kintner, C.) およびアンダーソン, ディー・ジェイ(Anderson, D. J.)、(1996)、「ニューロゲニン、脊椎動物ニューロン決定遺伝子の同定」、Cell 87, 43-52; マコーミック(McCormick)ら、1996)、またはジンクフィンガー転写因子MyT1 (ベレフロイド, イー・ジェイ(Bellefroid, E. J.)、ブルゴーニャン, シー(Bourguignon, C.)、ホールマン, ティー(Hollemann, T.)、マー, キュー(Ma, Q.)、アンダーソン, ディー・ジェイ(Anderson, D. J.)

、キントナー、シー (K i n t n e r, C.) およびピーラー、ティー (P i e l e r, T.)、1996、「ニューロン分化における調節機能を有する X-M y T 1、アフリカツメガエル C 2 H C 型ジンクフィンガータンパク質」、C e l l 87, 1191-1202) または Z i c 3 (ナカタ (N a k a t a) ら、1997) の強制発現によって、追加の神経原性転写因子の誘導および両生類外胚葉細胞のニューロン分化の開始が起きる。

【0034】

さらには、遺伝子調節のレベルで、神経原性 b H L H 転写因子の作用は、転写を抑制することが知られている H E S ファミリーの転写因子により拮抗される。発生ニューロン細胞での H E S 1 タンパク質の過剰発現は、ニューロン分化を阻止し (イシバシ (I s h i b a s h i) ら、1994)、一方その発現を阻止すると、ニューロン分化が刺激される (イシバシ (I s h i b a s h i) ら、1995)。すなわち、ニューロン分化は、他の生物学的プロセスと同様に、正および負の因子の両方により調節される。

【0035】

両生類の発生の間に機能することが知られている分子調節機作を、本発明の理論的基礎として利用した。本発明の方法および細胞産物は、ヒトニューロン分化の負の調節物質の抑制と協調して行われる、ヒトニューロン分化を正に調節する転写因子の誘導発現が、表皮細胞から新しく創り出したニューロンへの変換を生じさせるという発見に基づく。

【0036】

これらの分子的機作を利用する本発明の方法によって、表皮基底細胞は、神経前駆細胞、ニューロン細胞または神経膠細胞の 1 つまたはそれ以上の形態学的、生理学および/または免疫学的特徴を有する細胞に分化転換する。形態学的特徴は、例えば、長さが少なくとも約 50 マイクロメートルの 1 つまたはそれ以上のニューロン細胞を特徴づける軸索突起様突起を含む。生理学および/または免疫学的特徴は、1 つまたはそれ以上の特異的マーカーの発現および/または神経成長因子および他のサイトカインに対する独特の生理学的応答を含む。細胞の、または詳細には細胞膜の電気化学的特性もまた、種々の型のニューロン細胞に

特有のドーパミンまたはγ-アミノ酪酸（GABA）のような調節因子の、分化転換した細胞による産生および分泌と同様に、生理学的特徴に含まれる。

【0037】

本発明の方法により、増殖表皮基底細胞集団が培養される。すなわち、表皮基底細胞を、新しく創り出した神経前駆細胞、ニューロン、および神経膠細胞に、分化転換または変換する方法は、哺乳動物の被験体（例えば、ヒト患者）の皮膚から表皮細胞を入手するところから始まる。増殖表皮基底細胞集団の細胞は、ヒト被験体を含む任意の哺乳動物被験体から得られる。細胞は、被験体の皮膚生検のような外科的治療から生じる組織試料から直接得られるか、または被験体の培養または貯蔵表皮基底細胞から間接的に得ることができる。

【0038】

皮膚組織試料中のまたは基底表皮細胞と角化非基底表皮細胞との培養混合集団中の表皮基底細胞は、好ましくは混合細胞集団を無カルシウム増殖培地に暴露することにより、最終分化した角化表皮細胞から分離される。本発明の目的には、無カルシウム培地は、 10^{-6} M未満のカルシウムカチオン（ Ca^{2+} ）を含有する。低いカルシウムカチオン濃度によって、基底細胞からケラチン形成性上部表皮層の剥離が起こる。（例えば、ピー・ケー・ジェンセン（P. K. Jensen）とエル・ボーランド（L. Bolund）、「ヒト表皮培養物における分化細胞層の低 Ca^{2+} 剥離：表皮再生のインビトロモデル」、Experimental Cell Research 175:63-73、[1988]）。次に基底細胞は、吸引またはデカンテーションのような任意の便利な方法により角化細胞から物理的に分離、選択または単離される。カルシウムカチオンは、基底細胞から角化細胞（皮膚細胞）の発生を支持するために必要とされ、増殖培地にカルシウムを戻すと、脱分化細胞集団中に急速な基底細胞増殖が起こり（ジェンセン（Jensen）とボーランド（Bolund）[1988]）、従って増殖表皮基底細胞集団が培養される。分化した角化細胞から分離、単離、または選択した後の個々の表皮基底細胞に関して、これ以上脱分化工程を行うことは必要ではない。

【0039】

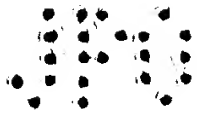
しかし表皮基底細胞以外の増殖型細胞では、脱調節される任意の特定の発生経路の発生を支持するのにカルシウムは必要とされない。脱分化の所望の目的を達成するための他の手段は、特異的な成長因子またはサイトカインによる細胞の処理を伴う。また、増殖培地中のカルシウムを排除する代わりに、遺伝子操作による表皮細胞の分化を担当する特異的な遺伝子発現経路を変更してもよい。さらに、増殖表皮基底細胞以外の細胞を使用するならば、カルシウムの排除は必要ではない。

【 0 0 4 0 】

次に表皮基底細胞のトランスフェクションまたはそれ以外の遺伝子修飾が、神経分化を担当する神経原性転写因子をコードする少なくとも1つのcDNAを含む1つまたはそれ以上の発現ベクターを用いて、インビトロで行われる。適切なcDNAは、NeuroD1、NeuroD2、ASH1のような塩基性らせんループ-らせんアクチベーター、およびZic3のようなジンクフィンガー型アクチベーター、およびMyT1、またはbHLHおよび/またはZn-フィンガー神経原性遺伝子を含む他のcDNAを含む。転写因子は、好ましくはヒト起源のものであるが、本発明では相同的な非ヒト対応物を利用することもできる。NeuroD1、NeuroD2、ASH1、Zic1、Zic3、およびMyT1のこのような非ヒト対応物の配列は、例えば、NCBIのジーンバンク (GenBank) データベースから利用可能である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。神経原性転写因子遺伝子は、発現ベクターのプロモーターに機能的に結合して（すなわち、転写ユニットは、遺伝子が転写されるものから形成され）、遺伝子送達後、そこから遺伝子産物が細胞中で翻訳されるmRNAを産生する。従って本発明の方法により、神経原性転写因子の発現は、好ましくはサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターのような構成性に発現される真核生物プロモーターにより制御される。

【 0 0 4 1 】

細胞への遺伝子送達は、任意の適切なインビトロ遺伝子送達方法による。（例えば、ディー・ティー・カリエル (D. T. Curriel) ら、米国特許第5, 521, 291号および5, 547, 932号）。典型的には、遺伝子送達は、



例えば、有効量の脂質トランスフェクション剤（リポフェクション（lipofection））と混合した適切なベクターと一緒にした、前もって選択した遺伝子材料を含む遺伝子送達混合物への細胞の暴露を伴う。この混合物の各成分の量は、細胞の特異的な種への遺伝子送達が最適になるように選択される。このような最適化は、日常的な実験を要するだけである。脂質に対するDNAの比は、幅広く、好ましくは約1：1であるが、使用される脂質物質とDNAの型に応じて他の割合を利用してもよい。この割合は、決定的に重要ではない。他の周知の遺伝子送達方法は、電気穿孔法または化学的方法を含む。（例えば、エム・オストレッシュ（M. Ostresh）、「入るに障壁なし：トランスフェクションの道具は戸口に生体分子を得る」、The Scientist 13（11）：21-23 [1999]）。

【0042】

本明細書において使用される「遺伝子送達物質」は、外来DNAセグメントの哺乳動物細胞中への摂取を増強するために遺伝子材料に添加される組成物を意味する。この増強は、遺伝子送達物質の非存在下の摂取に比較して測定される。遺伝子送達物質の例は、アデノウイルス-トランスフェリン-ポリリジン-DNA複合体を含む。これらの複合体は一般に、細胞中へのDNAの摂取を増大させ、そして細胞質を通る細胞の核へのその運搬の間の分解を減少させる。

【0043】

免疫リポソームトランスフェクション法は、遺伝子送達の好ましい手段である。Ca-共沈、またはリポフェクタミン（Lipofectamine）（ライフ・テクノロジーズ（Life Technologies））、またはフュージーン-6（Fugene-6）（ベーリンガー・マンハイム社（Boehringer Mannheim, Inc.））のような遺伝子送達物質を使用するトランスフェクションのような、他の好適な方法でもまた、高いトランスフェクション効率を得られる。他の好ましい遺伝子送達物質は、リポフェクチン（Lipofectin）（登録商標）、DMRIE C、セルフェクチン（Cellfectin）（登録商標）（ライフ・テクノロジーズ（Life Technologies））、リポタクシー（LipoTAXI）（ストラタジーン（S

trata gene))、スーパーフェクト (Superfect) またはエフェクテン (Effectene) (キアジェン (Qiagen)) を含む。これらはウイルス物質ほど効率的な遺伝子送達物質ではないが、ウイルス由来遺伝子送達物質に普通は伴うサイズの制限なしに、脊椎動物ゲノムへの異種 DNA 配列の安定な組み込みを促進するという利点を有する。しかし、ウイルスまたはそのトランスフェクション性断片は、細胞への遺伝子材料の送達を促進するために使用することができる。適切なウイルスの例は、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヒト免疫不全ウイルスのようなレトロウイルス、マウスモロニー白血病ウイルスのような他のレンチウイルス、および水疱性口内炎ウイルス-糖タンパク質 (VSV-G) -マウスモロニー白血病ウイルスと呼ばれるモロニーウイルスに由来するレトロウイルスベクター、おたふくかぜウイルス、およびこれらの任意のウイルスのトランスフェクション性断片、および細胞の細胞質による目的 DNA セグメントの摂取 (および細胞質への放出) を促進する他のウイルス性 DNA セグメント、およびこれらの混合物を含む。全ての上記ウイルスは、これらを非病原性または低抗原性にするのに修飾を必要とする。他の既知のウイルス性ベクターシステムもまた有用である。

【0044】

トランスフェクション工程の次に、少なくとも 1 つの神経原性転写因子を発現、または過剰発現させ、それと同時にまたはほぼ同時に、ニューロン分化の抑制を担当する因子を不活化させる。この最後の工程は、増殖培地へのニューロン分化を抑制することが知られている少なくとも 1 つのアンチセンスオリゴヌクレオチド (例えば、ヒト MSX1 遺伝子および/またはヒト HES1 遺伝子 (または相対的な非ヒト対応物)) の添加、および細胞の増殖により達成される。

【0045】

すなわち、トランスフェクションした表皮基底細胞は、ヒト MSX1 遺伝子のセグメントのヌクレオチド配列および/またはヒト HES1 遺伝子のセグメントのヌクレオチド配列、またはこれらのいずれかの相対的な非ヒト対応物を、MSX1 または HES1 の機能性遺伝子産物の発現を抑制するのに十分な量で含んでなる、少なくとも 1 つのアンチセンスオリゴヌクレオチドの存在下で増殖させる

。MSX1とHES1両方の転写の抑制に向けられたアンチセンスオリゴヌクレオチドの十分な量は、培地中それぞれ約5～10 μ Mの濃度である。有用なアンチセンスオリゴヌクレオチド配列の例は、以下のヒトMSX1アンチセンスオリゴヌクレオチド配列：

5' -GACACCGAGTGGCAAAGAAGTCATGTC-3' (第1メチオニン) (MSX1-1; 配列番号: 13) または

5' -CGGCTTCCTGTGGTCGGCCATGAG-3' (第3メチオニン) (MSX1-2; 配列番号: 14) ; およびヒトHES1読み取り枠5'配列：

5' -ACCGGGGACGAGGAATTTTCTCCATTATATCAGC-3' (HES-1; 配列番号: 15) またはHES1読み取り枠中央配列2：

5' -CACGGAGGTGCCGCTGTTGCTGGGCTGGTGTGGTG TAGAC-3' (HES1-2; 配列番号: 16) に対応する2つのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。他のオリゴヌクレオチド配列もまた、これらが、ヒトまたは相等的な非ヒトMSX1遺伝子（例えば、ジーンバンク (GenBank) 受け入れ番号M97676 [ヒト] ; NM 002448 [ヒト] ; X62097 [ニワトリ] ; D82577. 1 [アンビストーマ・メキシカヌム (Ambystoma mexicanum)]) またはHES1遺伝子の少なくとも1つのセグメント（例えば、ジーンバンク (GenBank) 受け入れ番号Y07572 [ヒト] ; Q04666 [ラット] ; P35428 [マウス] ; AB019516 [イモリ] ; AB016222 [サッカロミセス・ポンベ (Saccharomyces pombe)] ; U03914 [サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)]) を含んでなる核酸にハイブリダイズする限り有用であり、MSX1またはHES1核酸を標的化（すなわち、ハイブリダイズ）することにより機能性MSX1および/またはHES1遺伝子産物の発現を妨げる。当業者であれば、コンピュータ化アルゴリズム（例えば、パワーブラスト (PowerBLAST)、キューブラスト (QBLAST)、PSI-ブラスト (BLAST)、PHI-ブラスト

(BLAST)、ギャップ化または非ギャップ化ブラスト (BLAST)、またはベイラー医科大学 (Baylor College of Medicine) サーバーを通じての「アライン (Align)」プログラム) を使用して、ゲノムデータベース (例えば、国立バイオテクノロジー情報センター (National Center for Biotechnology Information)) (NCBI) のジーンバンク (GenBank) データベース) の配列類似性検索を行うことにより、他の有用なMSX1および/またはHES1オリゴヌクレオチド配列を容易に発見することができる。(例えば、アルチュール, エス・エフ (Altschul, S. F.) ら、「ギャップ化ブラスト (BLAST) およびPSI-ブラスト (BLAST) : 新世代のタンパク質データベース検索プログラム」、Nucleic Acids Res. 25 (17) : 3389-402 [1997] ; チャン, ジェイ (Zhang, J.) とマッデン, ティー・エル (Madden, T. L.) , 「パワーブラスト (PowerBLAST) : 相互または自動配列解析および注釈のための新しいネットワークブラスト (BLAST) アプリケーション」、Genome Res. 7 (6) : 649-56 [1997] ; マッデン, ティー・エル (Madden, T. L.) ら、「ネットワークブラスト (BLAST) サーバーのアプリケーション」、Methods Enzymol. 266 : 131-41 [1996] ; アルチュール, エス・エフ (Altschul, S. F.) ら、「基本的なローカルアラインメント検索ツール」、J. Mol. Biol. 215 (3) : 403-10 [1990]) 。

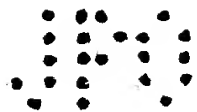
【0046】

好ましくは、アンチセンスオリゴヌクレオチドの1つまたはそれ以上のヌクレオチド残基は、実施者により、または市販用または他の供給業者により使用される既知の合成方法によりチオ修飾され、培地中および細胞中のオリゴヌクレオチドの安定性を増大させる。(例えば、エル・ベロン (L. Bellon) ら、「4'-チオ-オリゴヌクレオチド-リボヌクレオチド : ベータ-4'-チオ-オリゴウリジレートの合成、ヌクレアーゼ抵抗性、塩基対形成性、およびHIV-1逆転写酵素との相互作用」、Nucleic Acids Res. 21 (7

）：1587-93 [1993]；シー・レイディアー (C. Leydier) ら、「4'-チオールRNA：混合塩基4'-チオールオリゴヌクレオチドの合成、ヌクレアーゼ抵抗性、および相補的1本鎖および2本鎖との塩基対形成性」、Antisense Res. Dev. 5 (3)：167-74 [1995]）。

【0047】

トランスフェクションした細胞の増殖中に、アンチセンスオリゴヌクレオチドへの暴露は、増殖細胞中にあらかじめ存在するMSX1および/またはHES1タンパク質を分解するのに十分な時間である。比較的短い半減期の特定のタンパク質では、必要な暴露時間はわずか数時間から1日である。比較的長い半減期のタンパク質は、アンチセンスオリゴヌクレオチドによる長い処理を必要とする。一般には約2～3日間の暴露時間で足りる。分化転換した細胞の発生のさらに別の過程は、インビトロであろうとインビボで移植されようと、これらが暴露されるインサイチュ（in situ）環境の合図に依存する。場合により、分化転換した細胞は、レチノイン酸またはビタミンAのようなレチノイド化合物、および場合により脳由来神経栄養因子 (BDNF)、毛様体神経栄養因子 (CNTF)、血小板由来成長因子 (PDGF)、神経成長因子 (NGF)、ニューロトロフィン (NT)-3、ニューロトロフィン (NT)-4、またはソニックヘッジホッグ (sonic hedgehog) (Shh) のような神経成長因子またはニューロトロフィン、および/またはこれらの任意の機能性断片を含む培地中で増殖させる。例えば、全-transレチノイン酸とBDNFにより新しく形成されたニューロン細胞を処理すると、GABA作動性ニューロンまたはニューロン様細胞 (ニューロフィラメントMを発現する) の発生が起こり、一方神経膠細胞-調整培地とソニックヘッジホッグ (sonic hedgehog) アミノ末端ペプチド (Shh-N) により処理すると、主としてドーパミン作動性のニューロン細胞の発生が起こる。Shh-Nによる処理は、ネスティン (nestin)-免疫反応性細胞 (未定の神経前駆細胞) からのニューロンおよび乏突起神経膠細胞種の分化を促進し、BMP2の抗増殖性、星状膠細胞誘導性、乏突起神経膠細胞-抑制作用を阻害する。(例えば、ジー・チュー (G. Zhu)



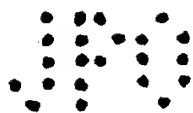
ら、「ソニックヘッジホッグ (sonic hedgehog) と BMP2 は、胚性神経前駆細胞の増殖および分化に反対の作用を発揮する」、Dev. Biol. 21591:118-29 [1999]。環境の合図に応じるこの適応性により、細胞は哺乳動物被験体に移植すると、アンチセンスオリゴヌクレオチドのさらなる添加なしに、インビトロまたはインサイチューのニューロン分化を維持できる。

【0048】

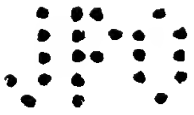
本方法により、任意の神経前駆細胞特異的、神経細胞特異的、および／または神経膠細胞特異的マーカーの発現は、従来の生化学的または免疫化学的手段により検出される。好ましくは、特に限定されないが、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)、免疫蛍光測定法 (IFA)、免疫電気泳動、免疫クロマトグラフィー測定法または免疫組織化学的染色法のような、免疫化学的手段が使用される。これらの方法では、任意の種々の神経前駆細胞、ニューロン細胞または神経膠細胞抗原に選択的に結合する、マーカー特異的ポリクローナルまたはモノクローナル抗体または抗体断片、例えば Fab、Fab'、F(ab')₂、または F(v) 断片を使用する。個々の特異的マーカーを標的とする抗体は、市販されており、かつ抗体製造業者により推奨されるように便利に使用される。神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞に特異的なマーカーは、例えば、ネスティン (nestin)、神経 RNA 結合タンパク質ムサシ (Musashi)、ニューロフィラメント M (NF-M; シグマ社 (Sigma, Inc.))、神経特異的チューブリン (シグマ社 (Sigma, Inc.))、神経特異的エノラーゼ (インクスター社 (Inctar, Inc.))、微小管結合タンパク質 2 (MAP2、ベーリンガーマンハイム (Boehringer Mannheim))、神経膠線維酸性タンパク質、O4、または神経前駆細胞、ニューロン細胞または神経膠細胞に特異的な任意の他の検出可能なマーカーの発現を示す、抗原性分子を含む。

【0049】

あるいは、神経前駆細胞特異的、神経細胞特異的または神経膠細胞特異的マーカーの発現は、特に問わないが逆転写酵素介在性ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-



PCR)、転写介在性増幅(TMA)、逆転写酵素介在性リガーゼ連鎖反応(RT-LCR)、またはハイブリダイゼーション分析のような、任意のマーカーをコードするmRNA転写体を増幅および分析するための従来の分子生物学的方法により検出される。神経前駆細胞、ニューロン細胞または神経膠細胞に特異的なマーカー(例えば、ネスティン(nestin)、神経RNA結合タンパク質ムサシ(Musashi)、ニューロフィラメントM、神経特異的チューブリン、神経特異的エノラーゼ、微小管結合タンパク質2、神経膠線維酸性タンパク質、O4)をコードする核酸配列は既知であり、ジーンバンク(GenBank)のようなデータベースにおいて利用可能である。当業者であれば、コンピュータ化アルゴリズム(例えば、パワーブラスト(PowerBLAST)、キューブラスト(QBLAST)、PSI-ブラスト(BLAST)、PHI-ブラスト(BLAST)、ギャップ化または非ギャップ化ブラスト(BLAST)、またはベイラー医科大学(Baylor College of Medicine)サーバーを通じての「アライン(Align)」プログラム)を使用して、国立バイオテクノロジー情報センター(National Center for Biotechnology Information)(NCBI)のジーンバンク(GenBank)データベースのようなゲノムデータベースの配列類似性検索を行うことにより、プライマーまたはプローブとして使用するための他の有用なマーカー特異的配列を容易に決定することができる。(例えば、アルチュール, エス・エフ(Altchul, S. F.)ら、「ギャップ化ブラスト(BLAST)およびPSI-ブラスト(BLAST):新世代のタンパク質データベース検索プログラム」、Nucleic Acids Res. 25(17):3389-402[1997];チャン, ジェイ(Zhang, J.)とマッデン, ティー・エル(Madden, T. L.)、「パワーブラスト(PowerBLAST):相互または自動配列解析および注釈のための新しいネットワークブラスト(BLAST)アプリケーション」、Genome Res. 7(6):649-56[1997];マッデン, ティー・エル(Madden, T. L.)ら、「ネットワークブラスト(BLAST)サーバーのアプリケーション」、Methods Enzymol. 266:131-41[1996];



アルチュール, エス・エフ (Altchul, S. F.) ら、「基本的なローカルアラインメント検索ツール」、J. Mol. Biol. 215 (3) : 403-10 [1990])。

【0050】

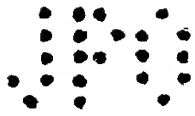
場合により、ニューロンまたはニューロン様細胞への表皮基底細胞の分化転換を検出するために形態学的基準が追加的に使用される。例えば、ニューロンまたはニューロン様細胞は、細胞直径の3倍以上(約50ミクロンまたはそれ以上)の軸索突起、または軸索突起様突起を発現しうる。

【0051】

本発明はまた、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の形態学的、生理学のおよび/または免疫学的特徴を有する、表皮起源の分化転換した細胞に関する。本発明の細胞は、表皮基底細胞を、必ずしもそうとは限らないが、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞(星状細胞、稀突起神経膠細胞、または小神経膠細胞)の、1つまたはそれ以上の形態学的、生理学のおよび/または免疫学的特徴を有する細胞に分化転換する本発明の方法により生成することができる。細胞は、表皮基底細胞から分化転換した細胞の培養子孫細胞を含む。

【0052】

「神経前駆細胞」は、生理学的特徴として、分化に適した生理学的条件(例えば、特定の神経栄養因子の存在)下で、ニューロン細胞または神経膠型細胞、すなわち、ニューロン、星状細胞(すなわち、星状膠細胞)、稀突起神経膠細胞(すなわち、乏突起神経膠細胞)、および小神経膠細胞に特異的に関連した、1つまたはそれ以上の形態学的、生理学のおよび/または免疫学的特徴を示す能力を有する外胚葉由来多能性幹細胞である。例えば、二能性神経前駆細胞は、毛様体神経栄養因子(CNTF)に暴露後に星状細胞に、または血小板由来成長因子(PDGF)に暴露後にニューロン細胞に分化する。(例えば、ジェイ・ケー・パーク(J. K. Park)ら、「二能性皮質前駆細胞は、ニューロンと神経膠細胞に対する相反する合図を階層的に処理する」、J. Neurosci. 19 (23) : 10383-89 [1999])。幾つかの神経前駆細胞は、ニューロ



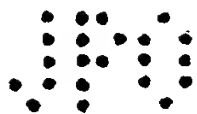
ンのみに分化しうる「神経に限定された」前駆細胞である。

【0053】

神経前駆細胞の存在は、ニューロン細胞または神経膠細胞への発生および分化の過程を決定するための適切な生理学的条件下で、機能性試験により検出することができる。好ましくは、神経前駆細胞は、細胞骨格タンパク質ネスティン (nestin) および／または神経RNA結合タンパク質ムサシ (Musashi) (MSI) のような、任意の幾つかの明確な特異的マーカーの発現を検出することにより同定される。(例えば、ティー・ナガタ (T. Nagata) ら、「マウス神経RNA結合タンパク質、ムサシ1 (Musashi1) の構造、基本骨格力学およびC末端RNA結合ドメインのRNAとの相互作用」、J. Mol. Biol. 287 (2) : 315-30 [1999]; ピー・グッド (P. Good) ら、「CNS幹細胞および神経前駆細胞においておそらく発現されている神経RNA結合タンパク質である、ムサシ (Musashi) /Nrp-1の相同体をコードするヒトムサシ (Musashi) 相同体1 (MSI1) 遺伝子」、Genomics 52 (3) : 382-84 [1998]; エス・サカキバラ (S. Sakakibara) ら、「マウスムサシ (Musashi) -1、哺乳動物CNS幹細胞において極めて濃縮された神経RNA結合タンパク質」、Dev. Biol. 176 (2) : 230-42 [1996])。

【0054】

「ニューロン」細胞、または「ニューロン様」細胞は、感覚ニューロン、運動ニューロン、または介在ニューロン型細胞を含む、ニューロン型細胞に関連した1つまたはそれ以上の神経特異的な形態学的、生理学的および／または免疫学的特徴を示す細胞を含む。実施者は、特定の応用に関して、分化転換した細胞が特定型のニューロン細胞集団に属するかどうかを決定するために使用される特異的特徴の機能的基準またはサブセットを選択することができる。有用な基準となる特徴は、形態学的特徴(例えば、長い突起または軸索突起); 生理学的および／または免疫学的特徴、例えば、神経特異的マーカーまたは抗原のあるセットの発現(例えば、ニューロフィラメントM、神経特異的 β -チューブリン、神経特異的エノラーゼ、微小管結合タンパク質2など); 神経伝達物質の合成(例えば、



ドーパミン；チロシンヒドロキシラーゼ（ドーパミン合成における重要な酵素）の発現；またはガンマアミノ酪酸 [GABA]）；神経伝達物質の受容体の存在；および／または膜興奮性および／または特定のサイトカインまたは成長因子に対する発生的応答のような生理学的特徴を含む。本発明の分化転換した細胞の利点は、特異的な外から供給されたシグナル分子の存在下でインビトロで、または特異的な微環境内でインビボで、これを実行して実施者の機能的な基準により明確になった多様なニューロン型にすることができることである。

【0055】

神経膠細胞または「神経膠様」細胞は、神経膠細胞（例えば、星状細胞または稀突起神経膠細胞）に特異的な形態学的、生理学的および／または免疫学的特徴（例えば、星状膠細胞マーカーの神経膠線維酸性タンパク質（GFAP）または乏突起神経膠細胞マーカーのO4の発現）を含む、神経膠型細胞に関連した1つまたはそれ以上の神経膠特異的特徴を有する細胞を含む。

【0056】

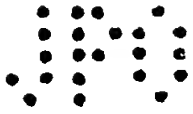
1つの実施態様において、分化転換した細胞は、神経前駆細胞における分化を誘導する細胞培養条件（例えば、ニューロトロフィンを含有する栄養強化培地（例えば、37℃で5%CO₂を含有する空気中のDMEM/F12に加えてニューロン細胞成長補足物質B27 [ギブコ (Gibco) -BRL]、10⁻⁷M全-transレチノイン酸および脳由来神経栄養因子 [BDNF; 20 ng/mL]））下で、有糸分裂活性の欠乏を示す。

【0057】

他の態様では、細胞は、GABA作動性細胞、すなわち、中枢神経系における支配的な阻害性神経伝達物質であるガンマアミノ酪酸を産生する細胞である。例えば、ラミニンでコーティングした表面に塗布した分化転換した細胞を全-transレチノイン酸（10⁻⁷M）およびBDNF（10 ng/mL）により5～15日間処理すると、GABA作動性ニューロンまたはニューロン様細胞が発生する。

【0058】

さらに別の態様では、分化転換した細胞は、ドーパミン作動性細胞、すなわち



、ドーパミン、カテコールアミン神経伝達物質、およびホルモンを産生する細胞である。これらの細胞は、神経膠細胞調整培地およびソニックヘッジホッグ (sonic hedgehog) アミノ末端ペプチドによる分化転換後処理により生じる。

【0059】

1つの態様において、分化転換した細胞は、神経膠線維酸性タンパク質 (GFAP) の発現のような、神経膠細胞の形態学的、生理学のおよび／または免疫学的特徴を有する。

【0060】

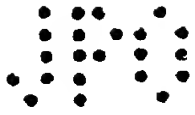
神経学的創傷または疾患に対する細胞治療または遺伝子治療アプローチにおける使用を必要とする患者に、埋め込みおよび／または移植することができることは、本発明の分化転換した細胞の利点である。分化転換した細胞は、細胞増殖の工程を必要とすることなく直接使用することができるため、有利である。

【0061】

本発明はまた、表皮基底細胞を起源とする本発明の分化転換した細胞から得られた細胞培養物に関する。細胞培養物は、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の形態学的、生理学のおよび／または免疫学的特徴 (例えば、1つまたはそれ以上の特異的マーカーの発現) を有する多数の細胞を含有する。この細胞培養物は、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞のインビトロ増殖に適した培養条件 (例えば、当該分野において知られている、適切な温度、pH、栄養分、および成長因子) 下で維持される。細胞培養物は、特異的な外から供給したシグナル分子の存在下で、追加のまたは異なる神経細胞特異的または神経膠細胞特異的マーカーを発現するように操作することができる。

【0062】

本発明の分化転換した細胞および細胞培養物は、その特徴および性質のため、ヒト神経系用の基本的バイオテクノロジーのツールとして有用である。さらには、本発明の分化転換した細胞および細胞培養物は、神経系疾患および障害用の細胞および遺伝子治療において使用するための技術的基準を満たす。第1に、本発明の分化転換した細胞および細胞培養物は、ニューロンの形態学的および機能的



特徴を示すことができる：これらは、末端に成長円錐を有する長い軸索突起を発生させることができ、多くの神経特異的遺伝子を発現し、そして分化を誘導する条件では増殖を続けない。従って、遺伝子治療および細胞治療における使用について、分化転換した細胞は、単一の可能性ある遺伝子または因子を送達することができるだけでなく、さらに神経再生のための基礎構造全体を与えることができる。

【0063】

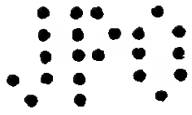
第2に、培養した分化転換した細胞は、増殖に適しておりかつ分化を誘導しない条件では、多能性神経系前駆細胞として増殖することができる。このため、これらの前駆細胞は、これらが暴露される環境の合図に応じて、多くの異なる型のニューロンまたはニューロン様細胞（例えば、GABA作動性またはドーパミン作動性細胞）になる能力を保持している。この広い適応性は、一旦移植されると、本発明の細胞が、多くの異なる宿主脳領域に適合し、かつ特定の宿主領域に特異的なニューロンに分化する能力を保持することを示唆している。分化転換したニューロンのこれらの固有の性質は、人工的な条件下で少量のニューロン分化を誘導することができる、既存の腫瘍原性細胞株とは異なる。

【0064】

第3に、本発明の分化転換した細胞および細胞培養物の別の利点は、細胞および遺伝子治療のためにニューロンを生成させるために利用される幹細胞テクノロジーでは必要な細胞拡張の必要がないことである。すなわち、本発明の分化転換した細胞は、直接移植のための数（数百万個の細胞）は足りている。要約すると、これらの分化転換した細胞および細胞培養物のユニークな特徴および性質によって、重要な科学的および商業的可能性ある発明が得られる。

【0065】

従って本発明はまた、ヒトを含む哺乳動物被験体の神経系において、インビボで局所分泌性調節因子を送達する方法に関する。この方法は、上述の本発明の方法による、ニューロン細胞の形態学的、生理学および／または免疫学的特徴を有する細胞への、被験体からの表皮基底細胞の集団の分化転換を伴う。移植拒絶を回避するために、分泌性調節因子による処理を必要とする特定の被験体の表皮



基底細胞が好ましい。分化転換工程の前、最中、または後に、上述の既知の方法により、前もって決定した分泌性調節因子、その生化学的前駆体、またはこの因子または前駆体のいずれかの生合成を触媒する酵素をコードするDNAを含んでなる発現ベクターにより、インビトロで細胞を遺伝子修飾し、そして遺伝子修飾された細胞を選択し、培養し、そして被験体に移植する。細胞のトランスフェクションまたは遺伝子修飾では、前もって決定された分泌性調節因子またはその前駆体、またはこの因子または前駆体のいずれかの生合成を触媒する酵素をコードするDNAを含んでなる発現ベクターを送達する。調節因子、前駆体、または酵素の遺伝子の発現は、ニューロン特異的プロモーター（例えば、ニューロフィラメントプロモーターまたは神経特異的エノラーゼプロモーター）の転写制御下にある。遺伝子修飾した細胞による調節因子の分泌の増強が得られる。これは、電気化学的感覚、運動、または認識シグナルを伝達する接続のような、機能性ニューロン間接続の形成に依存しない。

【0066】

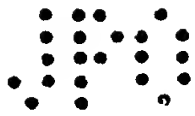
分泌性調節因子の例は、ドーパミンおよび神経栄養因子（例えば、神経成長因子（NGF）、脳由来成長因子（BDGF）、ニューロトロフィン-3、ニューロトロフィン-4、インスリン様成長因子、毛様体神経栄養因子（CNTF）、または神経膠細胞由来神経栄養因子）を含む。本方法を使用して治療することができる神経系障害は、アルツハイマー病、糖尿病性ニューロパシー、タキソールニューロパシー、圧迫性ニューロパシー、AIDS関連ニューロパシー、筋萎縮性側索硬化症、大線維性（large fiber）ニューロパシー、ピンクリスチンニューロパシー、およびパーキンソン病を含む。

【0067】

遺伝子修飾した分化転換細胞の移植は、従来法（例えば、定位注入）による。移植は、治療される特定障害に応じて、被験体の神経系内の適切な部位に行われる。

【0068】

一例として、本方法は、主に脳の黒質のドーパミン放出ニューロンの変性およびこれに続く線条のドーパミン神経伝達物質の枯渇により生じるパーキンソン病



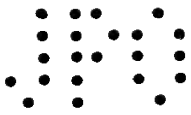
の治療において有利である。この変性の原因は、未知であるが、この疾患の運動変性症候は、本疾患の発症早期にドーパミン前駆体のL-ドーパを末梢に投与することにより軽減することができる。疾患が悪化を続けると、L-ドーパはもはや有効でなく、そして現在利用可能なさらなる治療法はない。開発されている1つの有望な治療法は、胎児脳から患者の脳の線条への高ドーパミンの黒質ニューロンの移植である。種々の臨床試験から得られた結果は、極めて楽観的であるが、1回の移植手術に十分な数の細胞を得るためには、10個もの胎児脳を必要とすることが推定される。この要求により、1つの治療様式として初代胎児ニューロンの移植の広い適用は実施不能である。しかしこの問題は、パーキンソン病の治療のための本発明の分化転換したニューロンまたはニューロン様細胞を利用することにより解決される。

【0069】

ドーパミン産生細胞の移植が、重篤なパーキンソン病の最も有望な治療法であることは、今や広く認識されている。ドーパミンを産生するように遺伝子修飾された安定な細胞集団または細胞株が、有効な治療には必須である。チロシンヒドロキシラーゼ (TH) はドーパミン生合成の重要な酵素であるため、適切な発現ベクターへのTH遺伝子のクローニングは、治療法の第1工程である。ヒトTH cDNAは、真核生物発現ベクターにクローン化される。遺伝子送達後、発現ベクターの安定な組み込みを示す遺伝子修飾された細胞のクローンは、移植のために選択される。すなわち、本発明の分化転換した細胞は、チロシンヒドロキシラーゼ (TH) 遺伝子の発現が増強されて産生される。

【0070】

これらの細胞は、患者の線条または脳内に移植される。細胞は典型的には、磁気共鳴画像法 (MRI) 誘導定位法を使用することにより、尾状核および被殻に両側性に移植される。局所麻酔後、定位枠を頭蓋に固定する。そして尾状核と被殻をMRIにより視覚化する。次に、全身麻酔下、尾状核と被殻に4mm間隔で非常に細い定位針で約10パスを両側に作る。胎児ドーパミンニューロン突起は、数ミリメートルに成長して宿主の線条に神経を再分布させるため、約4mm間隔でのトラックの間隔あけの原理は重要である。内包後脚を回避するために、尾状核



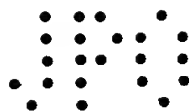
の針のトラックでは4つの軌跡、および被殻では6つのトラックが計算される。被殻および尾状核トラックの入口点は、脳表面の異なる2つの部位にある。被殻へのトラックは前頭面に対してほぼ垂直であり、一方尾状核へのアプローチは約30度の角度である。移植手術後、移植細胞はインサイチューでドーパミンを分泌して、被験体のパーキンソン病の症候を軽減する。

【0071】

本発明はまた、本発明の分化転換した細胞を利用する、新規な神経成長（または神経栄養）因子を単離または同定する方法に関する。本方法は、増殖表皮基底細胞の集団を、ニューロン前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞に分化転換すること；分化転換した細胞を培養すること；培養細胞をインビトロで可能性ある神経成長因子に暴露すること；および細胞の生存、または細胞の形態学的または電気生理学的特性および／または分子生物学的性質に及ぼす、可能性ある神経成長因子の作用の存在または非存在を検出することを伴う。分化転換した細胞は、分化転換した細胞の生理学的または分子生物学的性質に及ぼす、可能性ある神経成長因子の作用が存在するかどうかを測定するためにインビトロで評価される。例えば、あるとすればニューロンまたは神経膠型細胞のいずれが神経前駆細胞から発生するか、特定の型の細胞の成熟度、および細胞生存の継続支持（例えば、細胞数に及ぼす作用）を測定することができる。さらに、電気生理学的特性（パッチクランプ、異なる型の細胞内記録など）または分子生物学的性質（遺伝子発現プロファイル、細胞骨格の組織化、イオンチャネルおよび受容体の組織化など）に基づく実験技術を使用して、特定の型の細胞に及ぼす、可能性ある神経成長／神経栄養因子の作用を検出することができる。可能性ある因子は、必ずしもそうとは限らないが、単離化合物であってもよい；本発明の分化転換した細胞は、さらなる単離のための候補物質を検出するため、細胞の生存および機能性に及ぼす、可能性ある成長因子供給源（組織ホモジェネート、発現cDNAライブラリー産物など）の作用、またはその欠乏を試験、または評価するために使用することができる。

【0072】

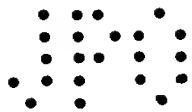
分化転換した表皮基底細胞を使用すると、脳からのニューロン型細胞を単離お



よび培養する困難が回避され、そのため、新規な神経成長因子を同定する本発明の方法は、この領域の研究にとって1つの利益である。

【0073】

この同じ利点は、上述の本発明の方法によりニューロン前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞に表皮基底細胞の集団を分化転換すること；分化転換した細胞を培養すること；培養細胞をインビトロで、可能性ある化学療法剤に暴露すること；および細胞の生存または該細胞の形態学的または電気生理学的特性および／または分子生物学的性質に及ぼす、可能性ある化学療法剤の作用の存在または非存在を検出することにより、可能性ある化学療法剤（すなわち、薬物）を同定するための、表皮基底細胞から分化転換した細胞の本発明の使用方法にも関係する。細胞生存、細胞の形態学的または電気生理学的特性および／または分子生物学的性質を変化させる作用は、化学療法剤の活性を示す。可能性ある化学療法剤は、神経系障害を治療することを意図した物質であってよいが、または本方法は、任意の他の型の障害を治療することを意図または目的とした物質の、神経前駆細胞、ニューロン細胞または神経膠細胞の特徴を有する細胞に及ぼすその作用について試験するために使用することができる。電気生理学的特性（パッチクランプ、異なる型の細胞内記録など）または分子生物学的性質（遺伝子発現プロフィール、細胞骨格の組織化、イオンチャネルおよび受容体の組織化など）、さらには細胞生存に基づく実験的測定法は、特定の型の細胞に及ぼす、可能性ある化学療法剤の作用を検出するために使用することができる。可能性ある化学療法剤は、必ずしもそうとは限らないが、単離化合物であってもよい；本発明の分化転換した細胞は、さらなる単離および開発のための候補物質を検出するための細胞の生存および機能に及ぼす、可能性ある化学療法剤（組織ホモジェネート、発現cDNAライブラリー産物など）の作用を試験または評価するために使用することができる。培養してニューロンまたはニューロン様細胞に分化転換した表皮基底細胞は、幾つかの神経伝達物質および受容体複合体を発現することができるため、成熟ニューロンに分化すると、神経伝達物質受容体複合体のユニークなプロフィールを示すこれらの細胞由来の細胞株が発生しうる。このようなニューロン細胞株は、可能性ある化学療法剤の設計およびスクリーニングのための有用な



手段になりうる。

【0074】

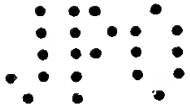
本発明はまた、遺伝子起源の神経系障害（例えば、アルツハイマー病）を治療するための可能性ある化学療法剤をスクリーニングするための、分化転換した細胞または細胞培養物の使用方法に関する。本方法は、可能性ある化学療法剤のスクリーニングの上述の方法により実施されるが、遺伝子起源の特定の神経系障害と診断されたヒト被験体由来の表皮基底細胞は、分化転換し、そして分化転換した細胞の生理学的または分子生物学的性質に及ぼす、可能性ある化学療法剤の作用がインビトロで評価される。本発明の分化転換した表皮基底細胞由来の異なる型のニューロン細胞は、可能性ある化学療法剤をスクリーニングするための新規な方法を提供する。例えば、神経系に影響する遺伝子欠損した患者からの表皮基底細胞の使用によって、この遺伝子欠損も有する種々の型のニューロン細胞集団の発生を誘導するように環境の合図を操作することができる。これらの細胞は、特異的なセットまたはプロフィールの神経伝達物質、受容体複合体、およびイオンチャネルを示す、罹患ニューロンまたはニューロン様細胞に及ぼす作用を有する可能性のある化学療法剤のスクリーニングのために使用することができる。

【0075】

インビトロの特定のセットの環境条件下で、本発明の分化転換した細胞が、インビボの所定のニューロン集団の全ての生化学的、形態学的、および機能的特性を発現するかどうかにかかわらず、これらは、有望な新しい薬物または神経成長因子を同定、スクリーニング、または単離するための、ニューロンの少なくとも有用なシミュレーションを提供する。一旦化学物質の可能性が本発明の方法により同定されたら、さらに研究を行って神経系の特定細胞集団に及ぼすその実際の作用を証明し、かつその臨床的有用性を確認する。すなわち、可能性ある化学療法剤をスクリーニングする本発明の方法は、特異的な脳機能の修飾に精密に狙いを定めた次世代の薬剤を発見および開発するのに有益である。

【0076】

本発明はまた、表皮基底細胞を、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の1つまたはそれ以上の形態学的、生理学的および／または免疫学的特徴



を有する細胞に、分化転換するためのキットに関する。このキットは、本発明の方法による表皮基底細胞の分化転換を促進するための材料の集合である。

【0077】

本発明のキットは、好ましくは以下の発現ベクターおよび試薬を含む：NeuroD1、NeuroD2、ASH1、Zic1、Zic3、およびMyT1のような神経原性転換因子、またはその断片をコードするcDNA、または相同的な非ヒト対応物を含有する1つまたはそれ以上の発現ベクター、ヒトMSX1遺伝子および/またはヒトHES1遺伝子のセグメントまたは一部に対応する少なくとも1つのアンチセンスオリゴヌクレオチド、または相同的な非ヒト対応物、レチノイドおよび少なくとも1つのニューロトロフィン（例えば、BDNF、CNTF、PDGF、NGF、NT-3、NT-4、および/またはソニックヘッジホッグ（sonic hedgehog））、またはこれらの任意の活性断片。必須ではないが好ましくは、本キットは、例えば患者自身の皮膚細胞から開始して、哺乳動物被験体の表皮基底細胞の分化転換用キット成分を使用するための説明書を含む。

【0078】

本発明のキットに組み立てられる材料または成分は、その操作性と有用性を保持する任意の便利で適切な方法で貯蔵して、実施者に提供することができる。例えば成分は、溶解型、脱水和型、または凍結乾燥型であってよい；これらは、室温、冷蔵温度または凍結温度で提供することができる。本発明のキットは、好ましくは本発明の方法の任意または全てを有効に実施するための材料または成分を使用するための説明書を含む。

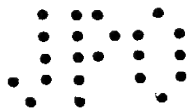
【0079】

【発明の実施の形態】

本発明の方法、分化転換した細胞、細胞培養物、およびキットの前記説明は、例示的なものであり、決して網羅的なものではない。ここで本発明は、以下の非限定例を参照しながらさらに詳細に説明される。

【0080】

【実施例】



例 I

表皮細胞培養物の調製および脱分化

成人の皮膚は、外科手術または皮膚生検から入手した。培養前に、できるだけ多くの表皮下組織を穏やかにこすり取って除去した。初代培養は、4～10個の2×2mm外植片/35mm組織培養皿を、15%ウシ胎児血清（ギブコ（GIBCO）-BRL、ライフテクノロジーズ社（Life Technologies, Inc.））、0.4μg/mlヒドロコルチゾン、および10ng/ml表皮成長因子（コラボラティブ・リサーチ社（Collaborative Research, Inc.））を含むダルベッコー改変イーグル培地（ギブコ（GIBCO）-BRL、ライフテクノロジーズ社（Life Technologies, Inc.））で培養することにより開始した。培地は、3日毎に交換した。30～35日齢の培養物を次の実験のために使用した。トランスフェクションおよびさらなる処理の前に、分化した細胞層は、培養物を無Ca²⁺最小必須培地（ギブコ（GIBCO）-BRL、ライフテクノロジーズ社（Life Technologies, Inc.））でインキュベートすることによりはがした。一般に、無カルシウム培地は、10⁻⁶M未満のCa²⁺イオンを含有する。72時間後、基底上層を分離して、培養皿の振盪後除去した。この無カルシウム処理もまた、表皮細胞が、表皮細胞の特徴であるサイトケラチンの発現をゆるめるにつれ、表皮基底細胞を脱分化させる。次に培養物は、正常Ca²⁺濃度、すなわち、全ての添加剤（すなわち、FCS（15%）、ヒドロコルチゾン（0.4μg/ml）、EGF（10ng/ml））を含有する2mMカルシウムイオンの培地に再供給して、5%CO₂を含有する大気中で37℃で18～24時間培養した。

【0081】

例II

培養表皮細胞のトランスフェクション

表皮基底細胞は、Ca共沈プロトコール（ギブコ（GIBCO）-BRL、ライフテクノロジーズ社（Life Technologies, Inc.））、リポフェクタミン（Lipofectamine）試薬（ギブコ（GIBCO）-BRL、ライフテクノロジーズ社（Life Technologies, Inc.））

nc.))、および免疫リポソーム(ホルムバーグ(Holmberg)ら、1994)を使用してトランスフェクションした。Ca共沈およびリポフェクタミン(Lipofectamine)試薬は、製造業者の指示通りに使用した。10 μ gのpRcCMVneo真核生物発現ベクター(インビトロジェン(Invitrogen))単独、または β -ガラクトシダーゼ(CMV- β -gal)、NeuroD1(CMV-ND1)、NeuroD2(CMV-ND2)、hASH1(CMV-hASH1)、Zic1(CMV-Zic1)、またはhMyT1(CMV-MyT1)cDNAのいずれかを含有するクローン化pRcCMVneoのいずれかを使用して、1つの35mm組織培養皿で細胞をトランスフェクションした。我々の実験室では、ジーンバンク(GenBank)からの配列情報を利用して全てのcDNAがクローン化された:受け入れ番号:hNeuroD1 D82347(配列番号:1および7);U50822(配列番号:2および8);hNeuroD2 U58681(配列番号:3および9);hASH1 L08424(配列番号:4および10);hZic1 D76435(配列番号:5および11);hMyT1 M96980(配列番号:6および12)。全てのクローン化遺伝子はヒト起源であった。

【0082】

オリゴヌクレオチドプライマーは、目的の配列に基づき設計して、RT-PCR法および鋳型としてヒト胎児脳mRNAを使用して完全長cDNAを増幅するために使用した。また、NeuroD1、NeuroD2およびhASH1 cDNAは、ヒト胎児脳cDNAライブラリー(ストラタジーン(Stratagene))をスクリーニングすることにより単離した。全てのcDNA配列は、配列決定および網状赤血球溶解物インビトロ翻訳システム(アマシャム(Amersham))を使用するインビトロ翻訳により証明した。

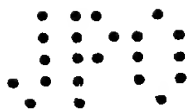
【0083】

例III

アンチセンスオリゴヌクレオチドの調製および使用

ヒトMSX1アンチセンスオリゴヌクレオチド配列:

1) 5'-GACACCGAGTGGCAAAGAAGTCATGTC-3' (



第1メチオニン) (MSX1-1; 配列番号: 13); および
2) 5' -CGGCTTCCTGTGGTCGGCCATGAG-3' (第3メ
チオニン) (MSX1-2; 配列番号: 14) を合成した。さらに、ヒト胎児脳
cDNAライブラリーからヒト完全長HES1 cDNAを単離して、配列決定
した(ストラタジーン(Stratagene))。ヒトHES1読み取り枠5
' 配列:

1) 5' -ACCGGGGACGAGGAATTTTCTCCATTATAT
CAGC (HES-1; 配列番号: 15) および中央配列:

2) 5' -CACGGAGGTGCCGCTGTTGCTGGGCTGGTGT
GGTGTAGAC (HES1-2; 配列番号: 16) に対応する2つのアンチ
センスオリゴヌクレオチドを合成した。好ましいアンチセンスオリゴヌクレオチ
ドは、既知の方法によりチオ修飾されている。従って、ヒトMSX1およびヒト
HES1に対応するチオ修飾型のこれらのオリゴヌクレオチドを合成して、培地
中および細胞中のオリゴヌクレオチドの安定性を増大させるために使用した。

【0084】

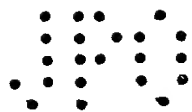
以下に記述される実験プロトコールにおいて、オリゴヌクレオチドは、5~1
0 μ Mの濃度で直接培地に加えた。ランダムに合成したオリゴヌクレオチドおよ
びヒトアルブミンの配列に対応するオリゴヌクレオチドを、対照として使用した。

【0085】

例IV

分化転換を検出するための分析方法

ニューロン分化の1つのマーカーとして、ニューロフィラメントM発現の免疫
組織化学的検出を選択した。細胞は、4%パラホルムアルデヒドで固定して、抗
体製造業者(シグマ社(Sigma, Inc.))が推奨する免疫組織化学的検
出プロトコールにより処理した。ニューロフィラメントM陽性細胞は、蛍光顕微
鏡により計測した。ニューロン抗原に対するさらに幾つかの抗体を使用して、さ
らに詳細にニューロンへの基底細胞の分化転換の性状を解析した。神経特異的チ
ューブリン(シグマ社(Sigma, Inc.))、神経特異的エノラーゼ(イ



ンクスター社 (Incstar, Inc.))、微小管結合タンパク質2 (MAP2、ベーリンガー・マンハイム (Boehringer Mannheim))、およびニューロフィラメントミックス (Mix) (スターンバーガー (Sternberger)) に対する抗体を、抗体製造業者が推奨する通りに使用した。神経膠線維酸性タンパク質 (GFAP、インクスター (Incstar)) に対する抗体を使用して、表皮基底細胞から星状細胞の分化を検出した。さらに、形態学的基準を使用して、ニューロン細胞への表皮基底細胞の分化転換を検出した。細胞直径の3倍を超える (50ミクロン以上) 軸索突起または突起を有しており、かつ少なくとも1つのニューロンマーカー (抗原) を発現する細胞を、ニューロンとして計測した。

【0086】

例V

分化転換プロトコールおよび実験結果

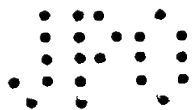
神経原性bHLHおよび/またはZnフィンガー転換因子の発現、または過剰発現、および実質的に同時のMSX1および/またはHES1発現の抑制をもたらし神経調節物質の種々の組合せを試験して、表皮基底細胞の分化転換に及ぼすこれらの作用を確認した。これらの実験の結果は、表1に与えられる。

【0087】

これらの実験では、最も高いトランスフェクション効率を得られるため、免疫リポソームトランスフェクション法が好ましい。Ca共沈、リポフェクタミン (Lipofectamine)、またはフューゼン-6 (Fugene-6) (ベーリンガー・マンハイム社 (Boehringer Mannheim, Inc.)) のような当該分野で既知の、高いトランスフェクション効率を得られる他のトランスフェクション法を、免疫リポソームの代わりに使用することができる。トランスフェクションおよびアンチセンスオリゴヌクレオチド処理後、細胞は全transレチノイン酸 (10^{-7} M) およびBDNF (20ng/ml) の存在下で5日間増殖後、免疫染色した。

【0088】

表1は、ニューロンのニューロフィラメント発現細胞へのインビトロでの表皮



基底細胞の変換をもたらす上述の分化転換法の結果を示す。神経原性 b H L H および／または Z n フィンガー転写因子の同時発現またはほぼ同時の発現、および M S X 1 および／または H E S 1 遺伝子の発現の抑制の種々の組合せを使用して、分化転換を開始させた。ニューロフィラメント M 免疫染色および軸索突起、または突起の長さ（50 ミクロン以上を軸索突起として計測した）の評価は、ニューロン細胞を同定するために利用した。p R C M V ベクタープラスミドと、ランダムに合成したオリゴヌクレオチド、およびヒトアルブミンの配列に対応するオリゴヌクレオチドを使用した対照は、表皮基底細胞の分化転換を示さなかった。ニューロフィラメント M を発現する細胞を、蛍光顕微鏡により計測した。各処理につき 5 ～ 7 視野（各視野は 100 ～ 300 細胞を含有する）の免疫染色細胞を計測した。

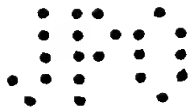
【 0 0 8 9 】

【表 1】

表 I

表皮基底細胞の分化転換

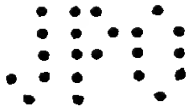
処理	ニューロン細胞 %
	(すなわち、ニューロフィラメント M 発現 %)
対照、非処理	0
過剰発現：	
NeuroD1	0.01
NeuroD2	0.03
ASH1	0
Zic1	0
MyT1	0
NeuroD1+Zic1	0.04
NeuroD2+Zic1	0.05
NeuroD1+NeuroD2+Zic1	0.05
NeuroD1+MyT1	0.02
NeuroD2+MyT1	0.03



NeuroD1+NeuroD2+MyT1	0.05
NeuroD1+NeuroD2+MyT1+Zic1	0.05
アンチセンスオリゴヌクレオチド:	
MSX1-1	0
MSX1-2	0
HES1-1	0
HES1-2	0
MSX1-1+MSX1-2+HES1-1+HES1-2	0
アンチセンスオリゴヌクレオチドと神経原性因子の過剰発現との組合せ	
NeuroD1+NeuroD2+MSX1-1+MSX1-2	0.5
NeuroD1+NeuroD2+HES1-1+HES1-2	0.8
NeuroD1+NeuroD2+MSX1-1+HES1-1	7
Zic1+MSX1-1+MSX1-2	0.05
Zic1+HES1-1+HES1-2	3
MyT1+MSX1-1+MSX1-2	0.01
MyT1+HES1-1+HES1-2	0.5
MyT1+MSX1-1+HES1-1	0.9
NeuroD1+Zic1+MSX1-1	11
NeuroD1+Zic1+MSX1-1+HES1-1	20
NeuroD1+MyT1+MSX1-1	10
NeuroD1+MyT1+MSX1-1+HES1-1	26
NeuroD1+Zic1+MyT1+MSX1-1+HES1-1	25

【 0 0 9 0 】

要約すると、ニューロンへの表皮細胞の分化転換は、ニューロン分化を正に調節する神経原性転写因子と、ニューロン分化の負の調節物質に対応するアンチセンスオリゴヌクレオチドとの発現の組合せ作用により最も良好に達成される。実験データは、ニューロンへの表皮細胞の分化転換の好適な方法が、bHLHとジックフィンガー転写因子の両方の発現を含むことを示しており、これが、表皮分化の負の調節物質に対応する少なくとも1つのアンチセンスDNAの存在下で、



ニューロン分化を正に調節する。さらに、2つの負の調節物質アンチセンスDNAの存在下の2つのbHLH転写因子の発現によって、かなり高いパーセントの分化ニューロンが得られた。

【0091】

例VI

分化転換したニューロン細胞の性状解析

分化転換プロセスおよび新しく生成したニューロン細胞をさらに評価するために、ニューロンマーカータンパク質に対する特異的抗体による免疫染色を使用し、これらの細胞中の幾つかのニューロンマーカー遺伝子の発現を分析した。これらの実験において、神経原性遺伝子のトランスフェクションとアンチセンスオリゴヌクレオチド処理の以下の組合せを使用した：

NeuroD1+Zic1+MSX1-1+HES1-1

NeuroD1+MyT1+MSX1-1+HES1-1

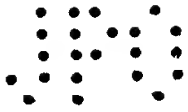
NeuroD1+Zic1+MyT1+MSX1-1+HES1-1

【0092】

これらの実験の結果は、ニューロフィラメントM陽性の分化転換した細胞もまた、神経特異的チューブリン、神経特異的エノラーゼ、および微小管結合タンパク質2を発現することを示している。分化転換した細胞の多くのニューロン抗原の発現と形態学的変化（50ミクロン以上の軸索突起）は、分化転換の進行によって、細胞治療応用において使用することができる正常かつ生存可能なニューロン細胞が得られることを示している。さらに、本発明の新しく生成したニューロン細胞は、ニューロンの形態学および機能的基準を有する：これらは、末端に成長円錐のある長い軸索突起を発生させ、多くの神経特異的遺伝子を発現し、そして全transレチノイン酸（ 10^{-7} M）およびBDNF（20ng/ml）の存在下でのような、分化を誘導する条件で増殖を続けない。

【0093】

最後に、神経膠線維酸性タンパク質に対する抗体による処理表皮細胞培養物の染色は、少ない割合（約5%）の細胞がGFAPをも発現することを示している。これは、分化転換した細胞が、直接または間接に星状膠細胞の特徴を獲得する



こと示している。1つの可能な説明は、神経原性遺伝子の発現と神経発生のインヒビターの発現の遮断とは、ニューロンと星状膠細胞の両方にインビトロで分化するニューロン前駆細胞を形成させることである。

【0094】

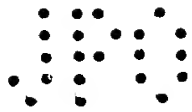
例VII

パーキンソン病における分化転換したニューロン細胞の遺伝子治療応用

パーキンソン病は、主として脳の黒質のドーパミン放出ニューロンの変性、およびその結果生じる線条のドーパミン神経伝達物質の渇きに起因する。この変性の原因は未知であるが、この疾患の運動変性症候は、疾患の発症早期でドーパミン前駆体のL-ドーパを末梢投与することにより軽減させることができる。疾患が悪化を続けると、L-ドーパはもはや有効でなく、そして現在利用可能なさらなる治療法はない。開発されている1つの有望な治療法は、胎児脳から患者の脳の線条への高ドーパミンの黒質ニューロンの移植である。種々の臨床試験から得られた結果は、極めて楽観的であるが、1回の移植手術のための十分な数の細胞を得るためには、10個もの胎児脳を必要とすることが推定される。この要求により、1つの治療様式として初代胎児ニューロンの移植の広い適用は実施不能である。しかしこの問題は、パーキンソン病の治療のための本発明の分化転換したニューロン細胞の利用により解決される。

【0095】

ドーパミン産生細胞の移植が、重篤なパーキンソン病の治療の最も有望な治療であることは、今や広く認識されている。ドーパミンを産生するように遺伝子操作された安定な細胞集団または細胞株は、有効な治療には必須である。チロシンヒドロキシラーゼ (TH) は、ドーパミン合成の重要な酵素であり、適切な発現ベクターへのこの遺伝子のクローニングは、治療の第1工程である。すなわち、ヒトTH cDNAは、ニューロン特異的プロモーター (例えば、ニューロフィラメント、神経特異的エノラーゼ) の制御下で真核生物発現ベクターにクローン化される。発現作成体は、高効率トランスフェクションプロトコール (リポフェクタミン (Lipofectamine)、Ca共沈など) を使用して患者の表皮基底細胞中にトランスフェクションされ、続いて発現ベクターの安定な組み込



みを示すクローンの選択が行われる。これらのクローンは、THを発現する新しく生成したニューロンを得るための分化転換法のために使用される。すなわち、チロシンヒドロキシラーゼ (TH) 遺伝子を発現する、本発明の分化転換した細胞に由来するヒトニューロンが産生される。これらの細胞が患者の線条または脳に移植される。第1に細胞は、磁気共鳴画像法 (MRI) 誘導定位法を使用することにより、尾状核および被殻に両側性に移植される。局所麻酔の投与後、定位枠を頭蓋に固定する。そして尾状核と被殻がMRIにより視覚化される。次に、全身麻酔下、尾状核と被殻に4 mm間隔で非常に細い定位針で約10パスを両側に作る。胎児ドーパミンニューロン突起は、数ミリメートルに成長して宿主の線条に神経を再分布させるため、約4 mm間隔でのトラックの間隔あけの原理は重要である。内包後脚を回避するために、尾状核の針のトラックでは4つの軌跡、および被殻では6つのトラックが計算される。被殻および尾状核トラックの入口点は、脳表面の異なる2つの部位にある。被殻へのトラックは前頭面に対してほぼ垂直であり、一方尾状核へのアプローチは約30度の角度である。

【0096】

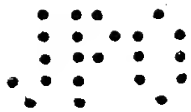
例VIII

脳への神経成長因子の送達のための分化転換したニューロン細胞の遺伝子治療応用

本発明の分化転換したニューロン細胞は、潜在的に興味ある神経成長（神経栄養）因子をコードする核酸によりトランスフェクションすることができる。種々の会社により現在臨床試験中または十分な開発下の成長因子の主たる例を、以下の表IIに列挙する。これまで、多くの成長因子は、多くの異なる集団のニューロンおよび非神経組織に影響するため、脳および神経系に及ぼす成長因子の作用の試験は、副作用の顕著なリスクを有するこれらの因子の大用量の直接の末梢注射に限定されていた。これらの問題は、これらの成長因子を安定に発現し、かつ移植後に成長因子を分泌する、分化転換したニューロン細胞株を作成することにより克服することができる。

【0097】

【表2】



表II

神経栄養因子および疾患

神経栄養因子	疾患
神経成長因子 (NGF)	アルツハイマー病 糖尿病性ニューロパシー タキソールニューロパシー 圧迫性ニューロパシー AIDS関連ニューロパシー
脳由来成長因子 (BDNF)	筋萎縮性側索硬化症
ニューロトロフィン3 (NT-3)	大線維性ニューロパシー
インスリン様成長因子 (IGF)	筋萎縮性側索硬化症 ビンクリスチンニューロパシー タキソールニューロパシー
毛様体神経栄養因子 (CNTF)	筋萎縮性側索硬化症
神経膠由来神経栄養因子	パーキンソン病

【0098】

幾つかの神経学的症状（表IIを参照のこと）を治療するための方法として、神経栄養因子の局所送達が生唆されてきた。患者自身の皮膚からの分化転換した表皮細胞は、神経栄養因子送達の輸送手段である。ヒト神経栄養因子 cDNA は、ニューロン特異的プロモーター（例えば、ニューロフィラメントまたは神経特異的エノラーゼ）の制御下で真核生物発現ベクター中にクローン化される。発現作成体は、高効率トランスフェクションプロトコール（リポフェクタミン (Lipofectamine)、Ca 共沈など）を使用して表皮基底細胞中にトランスフェクションされる。この手順に続いて、発現ベクターの安定な組み込みを示すクローンの選択が行われる。次にこれらのクローンは、特定の神経栄養因子を顕著に高レベルで発現する新しく生成したニューロンを得るための分化転換法に使用される。これらの神経栄養因子を発現するニューロン細胞は、例VIIに記載されるように、患者脳および／または神経系に、神経栄養因子送達を必要とする位置に移植される。

【0099】

例IX

神経外傷、卒中および神経変性疾患の治療法としての分化転換したニューロン細胞の細胞治療応用

多くの神経学的疾患では、パーキンソン病とは異なり、症候の基礎にある原因を単一因子に帰すことができない。この状態が、遺伝子治療による単一遺伝子の導入または細胞治療による単一ニューロン型置換という治療アプローチを無効にしている。むしろ消失または罹患した宿主ニューロン細胞またはさらにニューロン回路網の、健常細胞およびニューロン回路網による置換が必要とされる。本発明により我々は、患者自身の表皮基底細胞とは異なる型のニューロンを発生させることができる。これらの新しく生成したニューロンは、置換治療に使用することができる機能性ニューロン回路網の形成を刺激するために、別々にまたは一緒に培養することができる。あるいは、異なる型のニューロンを移植し誘導して、脳内または脊髄内で、インサイチューでそれら自体および宿主ニューロンとの間の機能性接続を形成させることができる。生成したニューロンが種々の型のニューロンにインビトロおよびインビボでデノボ分化する能力によって、このアプローチは、神経系における複雑な構造および回路網の置換のために特に強力かつ有用である。

【0100】

神経系における局所回路の回復の一例は、損傷脊髄における機能性「パターンジェネレータ」の形成である。幾つかのデータは、パターンジェネレータがヒトにおいて機能しており、そしてさらに物理療法により脊髄損傷患者における足踏みおよび脚の使用を刺激しうることを証明している。（総説に関しては、ウィッケルグレン、アイ（Wickelgren, I.）、1998、「脊髄に歩くことを教える」、Research News, Science 279, 319-321、1998を参照のこと）。パターンジェネレータは、求心性感覚ニューロンと運動ニューロンを接続する異なる型の介在ニューロンを伴う。分化転換した表皮基底細胞は、パターンジェネレータの機能に必要な全ての主要な型のニューロン細胞を形成するように処理される。ここで細胞は、自然なシナプス形成

が起こるように一緒に混合する。パターンジェネレータは、主要な興奮性（グルタミン酸作動性、コリン作動性）および阻害性（GABA作動性のレンショー細胞を含むグリシン作動性）ニューロンからなるため、第1に、これらの型のニューロンが上述の本発明の方法により作成される。第2に、第1工程で産生された興奮性および阻害性ニューロンを同時培養で増殖させて、ニューロン細胞の間の機能性接続の形成を刺激する。この工程によって、患者の損傷脊髄に移植されることになる細胞の凝集体が得られる。代替アプローチは、異なる型のニューロン細胞を別々に発生させ、脊髄への移植の前にこれらを混合することであろう。多数の異なる興奮性および阻害性ニューロンの移植を可能にするこれらの方法を使用することにより、脊髄の局所機能を支持することができる機能的セットのニューロン接続が発生する。

【0101】

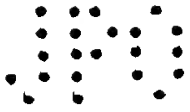
例X

新規な成長因子の検索における研究手段としての分化転換したニューロン細胞の使用

現代の神経生物学の中心原理の1つは、全てのニューロンでないとしても主要な投射ニューロンのそれぞれが、これらの標的細胞に到達し生存するために特異的シグナル（栄養因子）を必要とすることである。多くの疾患におけるニューロパシーは、このような成長因子により引き起こされるか、またはこれらの欠損を伴う。これらの成長因子は、次世代の神経系障害の予防薬および治療薬であり、このため、バイオテクノロジー産業で、新規な成長因子の検索および開発のために巨額の資金が投入されている。

【0102】

成熟ニューロンが、分化転換したニューロンから産生するという観察に内在するものは、細胞の型の最終決定、成熟度、および細胞生存の継続的支持を測定するために、これらの細胞を使用して種々の成長因子を試験することができるという事実である。これまでに知られている神経系におけるほとんどの成長因子は、末梢神経に及ぼすこれらの作用により発見され、そしてこれらは脳内に存在する成長因子の非常に小さい割合である可能性が高い。



【0103】

主として特定の型のニューロン細胞を脳から単離しかつ明確な培養条件で維持することが困難であるため、脳からの成長因子の検索は困難であった。分化転換した表皮細胞の使用はこの問題を克服し、可能性ある成長因子をスクリーニングするための新しい測定法に道を開く。

【0104】

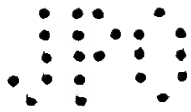
分化転換した表皮基底細胞から作成される異なる型のニューロン細胞は、新しいおよび既に性状解析された成長／神経栄養因子の作用の発見および分析のための新規な研究手段を提供する。表皮基底細胞は、特定のサブタイプのニューロンを特徴とする異なる型のニューロン細胞に分化転換する。これらの特異的なニューロン細胞は、細胞の生存および機能に及ぼす可能性ある成長因子供給源（組織ホモジェネート、発現cDNAライブラリー産物など）の作用を試験または測定するために使用される。例えば細胞数は、成長因子への暴露後ニューロン細胞の生存の分析のために計測される。当該分野において既知のこれらのニューロンの機能の広範囲の実験的分析を実施して、新しく生成したニューロンに及ぼすこれらの新規な成長因子の作用を測定することができる。電気生理学的特性（パッチクランプ、異なる型の細胞内記録など）および分子生物学的性質（遺伝子発現プロファイル、細胞骨格の組織化、イオンチャネルおよび受容体の組織化など）に基づく実験技術は、特定の型の細胞に及ぼす可能性ある神経成長／神経栄養因子の作用を検出するために使用される。

【0105】

例XI

薬物スクリーニングにおける研究手段としての分化転換したニューロン細胞の使用

脳からますます多くの神経伝達物質受容体およびシグナル伝達タンパク質が同定されるにつれ、1つの神経伝達物質が1つの受容体を活性化するという定説は、単純化しすぎであることが明らかになっている。ニューロンの多くの受容体複合体は、幾つかの遺伝子によりコードされるタンパク質サブユニットからなり、そして各遺伝子は、多くの異なる変種タンパク質を合成する。これらの変種によ



って、広範な可能性ある受容体組合せが生じるのであって、1つの神経伝達物質と相互作用できる単一受容体が生じるのではない。結果として、ある範囲のシグナル出力が、単一の神経伝達物質作用により生み出される。あるニューロンである神経伝達物質によりもたらされる特異的シグナルは、この細胞によりどの受容体複合体が産生されるかに依存する。すなわち、細胞の多様性は分子の多様性に一致し、脳機能の複雑さの基になる主要な構造要素を構成する。

【0106】

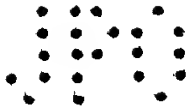
従来の薬理学による薬物の発見は、全脳ホモジェネートおよび動物を使用してこのような複雑さの知識なしに行われてきた。これらの研究は、たいいてい広い作用と副作用をもつ神経伝達物質の類似体を生み出した。特異的脳機能の修飾を目的とした次世代の薬剤は、神経伝達物質、受容体複合体、およびイオンチャネルのある特異的なプロフィールを示すニューロンに対する可能性ある化学物質をスクリーニングすることにより得られるかも知れない。

【0107】

培養でニューロンに分化転換した表皮基底細胞は、幾つかの神経伝達物質および受容体複合体を発現しうる。成熟ニューロンに分化すると神経伝達物質受容体複合体のユニークなプロフィールを示すこれらの細胞由来の細胞株が発生しうる。このようなニューロン細胞株は、可能性ある薬物の設計およびスクリーニングのための有用な手段になるであろう。

【0108】

インビトロの特定のセットの環境条件下で、本発明の分化転換した細胞が、インビボの所定のニューロン集団の全ての生化学的、形態学的、および機能的特性を発現するかどうかにかかわらず、これらは、有望な新しい薬物または神経成長因子を同定、スクリーニング、または単離するための、ニューロンの少なくとも有用なシミュレーションを提供する。一旦化学物質の可能性が本発明の方法により同定されると、さらに研究を行って、神経系の特定細胞集団に及ぼすその実際の作用を証明しかつその臨床的有用性を確認することができる。すなわち、可能性ある化学療法剤をスクリーニングする本発明の方法は、特異的な脳機能の修飾に精密に狙いを定めた次世代の薬剤を発見および開発するのに有益である。



【 0 1 0 9 】

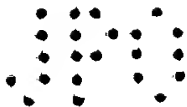
本発明の分化転換した表皮基底細胞から生成した異なる型のニューロン細胞は、可能性ある薬物をスクリーニングするための新規な方法論を提供する。例えば、神経系に影響する遺伝子欠損した患者からの表皮基底細胞の使用によって、この遺伝子欠損も有する種々の型のニューロン細胞を発生させることが可能になる。これらの細胞は、罹患ニューロンに及ぼす作用を潜在的に有する薬物のスクリーニングのために使用することができる。表皮基底細胞は、所望のサブタイプのニューロンの特徴を有する種々の型のニューロン細胞に分化転換する。これらの特異的なニューロン細胞は、細胞の生存および機能に及ぼす、可能性ある薬物の作用を試験または測定するために使用される。薬物への暴露後、ニューロン細胞の生存の分析のために、細胞数が計測される。広い範囲の電気生理学的（パッチクランプ、異なる型の細胞内記録など）および分子生物学的（遺伝子発現プロファイル、細胞骨格の組織化、イオンチャネルおよび受容体の組織化など）方法は、特定の型の細胞に及ぼす、可能性ある薬物の作用を検出するために使用することができる。

【 0 1 1 0 】

要約すると、本発明の分化転換神経細胞テクノロジーは、細胞治療と遺伝子治療の両方の領域において神経系障害を治療するための広く重要な可能性を提供し、さらには研究および薬物スクリーニングのためのヒトニューロンの可能性ある新しい供給源を提供する。

【 0 1 1 1 】

本発明は、現在最も実際的かつ好適な実施態様であると考えられるものに関して記載することができるが、本発明は、開示された実施態様に限定されないと理解すべきであり、それどころか、本発明は、本発明の説明および添加した請求項の精神と範囲内に含まれる種々の修飾および同等な変更をカバーするものである。すなわち、本発明中の変法は、明細書に記載され請求項に定義される本発明の新規な側面から逸脱することなく行うことができると理解すべきである。



特 2 0 0 0 - 0 4 8 2 9 1

【 0 1 1 2 】

【配列表】

<110> Cedars-Sinai Medical Center

Michel F. Levesque, M.D.

Toomas Neuman, Ph.D.

<120> Transdifferentiation of Transfected Epidermal
Basal Cells Into Neural Progenitor Cells, Neuronal Cells
And/Or Glial Cells

<130> CEDAR 044303

<140> 09/234,332

<141> 1999-01-20

<160> 16

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 2502

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

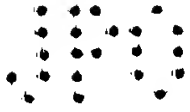
<221> gene

<222> (0)...(0)

<223> Neuro D1 gene: Genbank accession D82347

<400> 1

cgccacgac acgaggaatt cgccacgca ggaggcacgg cgtccggagg ccccagggtt 60
atgagactat cactgctcag gacctactaa caacaaagga aatcgaaaca tgaccaaate 120
gtacagcgag agtgggctga tgggcgagcc tcagcccca ggtcctccaa gctggacaga 180
cgagtgtctc agttctcagg acgaggagca cgaggcagac aagaaggagg acgacctga 240
agccatgaac gcagaggagg actcactgag gaacggggga gaggaggagg acgaagatga 300
ggacctggaa gaggaggaag aagaggaaga ggaggatgac gatcaaaagc ccaagagacg 360
cggcccaaaa aagaagaaga tgactaaggc tcgcctggag cgttttaaat tgagacgcat 420
gaaggctaac gcccgggagc ggaaccgcat gcacggactg aacgcggcgc tagacaacct 480
gcgcaagggtg gtgccttgct attctaagac gcagaagctg tccaaaatcg agactctgcg 540
cttgccaag aactacatct gggctctgtc ggagatcctg cgctcaggca aaagcccaga 600
cctggtctcc ttcgttcaga cgctttgcaa gggcttatcc caaccacca ccaacctggt 660
tgggggctgc ctgcaactca atcctcggac tttctgcct gagcagaacc aggacatgcc 720
ccccacctg ccgacggcca gcgcttctt ccctgtacac cctactcct accagtgcgc 780
tgggctgccc agtccgcctt acggtaccat ggacagctcc catgtcttcc acgttaagcc 840
tccgccgcac gcctacagcg cagcgctgga gcccttcttt gaaagccctc tgactgattg 900
caccagccct tcctttgatg gacccctcag cccgccgctc agcatcaatg gcaacttctc 960
tttcaaacac gaaccgtccg ccgagtttga gaaaaattat gcctttacca tgcactatcc 1020
tgcagcgaca ctggcagggg cccaaagcca cggatcaatc ttctcaggca ccgctgcccc 1080
tcgctgcgag atccccatag acaatattat gtccttcgat agccattcac atcatgagcg 1140
agtcatgagt gccagctca atgcatatt tcattgattag aggcacgcca gtttcacct 1200
ttccgggaaa cgaaccact gtgcttacag tgactgtcgt gtttacaaaa ggcagccctt 1260
tgggtactac tgctgcaaag tgcaaatact ccaagcttca agtgatatat gtattttattg 1320
tcattactgc ctttgaaga aacaggggat caaagttcct gttcacctta tgtattttt 1380
tctatagctc ttctatttaa aaaataaaaa aatacagtaa agtttaaaaa atacaccag 1440
aatttggtgt ggctgtattc agatcgtatt aattatctga tcgggataac aaaatcacia 1500
gcaataatta ggatctatgc aatttttaaa ctagtaatgg gccaatataa atatataaa 1560
atatataatt ttcaaccagc attttactac ttgttacctt tccatgctg aattattttg 1620
ttgtgatttt gtacagaatt tttaatgact ttttataatg tggatttcct attttaaaac 1680



特 2 0 0 0 - 0 4 8 2 9 1

catgcagctt catcaatttt tatacatatc agaaaagtag aattatatct aatttataca 1740
aaataattta actaatttaa accagcagaa aagtgccttag aaagttattg tgttgcctta 1800
gcacttcttt cctctccaat tgtaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaattg 1860
cacaatttga gcaattcatt tcactttaaa gtctttccgt ctccctaaaa taaaaaccag 1920
aatcataatt ttcaagagga gaaaaaatta agagatacat tccctatcac aacatatcaa 1980
ttcaacacat tacttgcaca agcttgtata tacatattat aaatagatgc caacataccc 2040
ttcttttaaa cacaagctgc ttgactatca catacaattt gcactgttac tttttagtct 2100
tttactcctt tgcattccat gattttacag agaatctgaa gctattgatg tttccagaaa 2160
atataaatgc atgattttat acatagtcac ccccatgggtg gggtgtcata tattcatgta 2220
ataaatctga gcctaaatct aatcaggttg ttaatgttgg gagttatata tatagtagtc 2280
aattagtaca gtagcttaaa taaattcccc ccatttaatt cataattaga acaatagcta 2340
ttgcatgtaa aatgcagtcc agaataagtg ctgtttgaga tgtgatgctg gtaccactgg 2400
aatcgatctg tactgtaatt ttgtttgtaa tcctgtatat tatgggtgtaa tgcacaattt 2460
agaaaacatt catccagttg caataaaata gtattgaaag tg 2502

<210> 2

<211> 1676

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> gene

<222> (0)...(0)

<223> Neurogenic helix-loop-helix protein (Neurod 1)

gene

Genbank accession J50822

<400> 2

acatcgatta actttttctc agaggcattc attttgtaat gggcaggtac ttttcgcaag 60

catttgtaca ggtttaggga gtggaagctg aaggcgatct ttcttttgat atagcgtttt 120
tctgcttttc tttctgtttg cctctccctt gttgaatgta ggaaatcgaa acatgaccaa 180
atcgtacagc gagagtgggc tgatgggcga gcctcagccc caaggtcctc caagctggac 240
agacgagtgt ctcagttctc aggacgagga gcacgaggca gacaagaagg aggacgacct 300
cgaagccatg aacgcagagg aggactcact gaggaacggg ggagaggagg aggacgaaga 360
tgaggacctg gaagaggagg aagaagagga agaggaggat gacgatcaaa agcccaagag 420
acgcggcccc aaaaagaaga agatgactaa ggctcgcttg gagcgtttta aattgagacg 480
catgaaggct aacgcccggg agcgggaaccg catgcacgga ctgaacgcgg cgctagacaa 540
cctgcgcaag gtggtgcctt gctattctaa gacgcagaag ctgtccaaaa tcgagactct 600
gcgcttggcc aagaactaca tctgggctct gtcggagatc tcgcgctcag gcaaaagccc 660
agacctggtc tccttcgttc agacgctttg caagggtta tcccaacca ccaccaacct 720
ggttgcgggc tgcctgcaac tcaatcctcg gactttctg cctgagcaga accaggacat 780
gccccgcac ctgccgacgg ccagcgcttc ctccctgta caccctact cctaccagtc 840
gcctgggctg ccagtcgcg cttacggtac catggacagc tcccatgtct tccacgttaa 900
gcctccgccg cagcctaca ggcagcgct ggagcccttc ttgaaagcc ctctgactga 960
ttgcaccagc ccttcctttg atggaccct cagcccgccg ctgagcatca atggcaactt 1020
ctctttcaaa cacgaaccgt ccgccgagtt tgagaaaaat tatgccttta ccatgacta 1080
tcctgcagcg aactggcag gggcccaaag ccacggatca atcttctcag gcaccgctgc 1140
ccctcgtgc gagatccca tagacaatat tatgtccttc gatagccatt cacatcatga 1200
gcgagtcag agtgcccagc tcaatgcat atttcatgat tagaggcacg ccagtttcac 1260
catttccggg aaacgaaccc actgtgctta cagtgactgt cgtgtttaca aaaggcagcc 1320
ctttggtact actgctgcaa agtgcaaata ctccaagctt caagtgatat atgtatttat 1380
tgtcattact gcctttggaa gaaacagggg atcaaagttc ctgttcacct tatgtattat 1440
tttctataga ctcttctatt ttaaaaaata aaaaaataca gtaaagtta aaaaatacac 1500
cacgaatttg gtgtggctgt attcagatcg tattaattat ctgatcgga taacaaaatc 1560
acaagcaata attaggatct atgcaatfff taaactagta atgggccaat taaaatatat 1620
ataaatatat atttcaacca gcattttact acttgttacc tcccatgctg aattat 1676

<211> 1550

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> gene

<222> (0)...(0)

<223> Neurogenic basic-helix-loop-helix protein (Neuro
D2) gene Genbank Accession U58681

<221> unsure

<222> (1219)...(1226)

<223> n at 1219 and 1226; n = A, T, G, or C

<400> 3

```

ccccctcatt tgtgctgtct gtctccccctt cccgcccgcg gggcgccctc aggcaccatg      60
ctgacccgcc tgttcagcga gcccggcctt ctctcggacg tgcccaagtt cgccagctgg      120
ggcgacggcg aagacgacga gccgaggagc gacaaggcg acgcgccgcc accgccaccg      180
cctgcgcccc ggccaggggc tccggggcca gcccgggcgg ccaagccagt ccctctccgt      240
ggagaagagg ggacggaggc cacgttggcc gaggtcaagg aggaaggcga gctgggggga      300
gaggaggagg aggaagagga ggaggaagaa ggactggacg aggcggaggg cgagcggccc      360
aagaagcgcg ggccaagaa gcgcaagatg accaaggcgc gcttggagcg ctccaagctt      420
cggcggcaga aggcgaacgc gcgggagcgc aaccgcatgc acgacctgaa cgcagccctg      480
gacaacctgc gcaaggtggt gccctgctac tccaagacgc agaagctgtc caagatcgag      540
acgctgcgcc tagccaagaa ctatatctgg gcgctctcgg agatcctgcg ctccggcaag      600
cggccagacc tagtgtccta cgtgcagact ctgtgcaagg gtctgtcgca gcccaccacc      660
aatctggtgg ccggtgtct gcagctcaac tctcgcaact tcttcacgga gcaaggcgcc      720
gacggtgccg gccgcttcca cggctcgggc ggcccgttcg ccatgcaccc ctaccggtac      780
ccgtgctcgc gcctggcggg cgcacagtgc caggcggccg gcggcctggg cggcggcgcg      840

```

gcgcacgccc tgcggaccca cggctactgc gccgcctacg agacgctgta tgcggcggca 900
 ggcggtggcg gcgcgagccc ggactacaac agctccgagt acgagggccc gctcagcccc 960
 ccgctctgtc tcaatggcaa ctctcactc aagcaggact cctcgcccga ccacagaaaa 1020
 agctaccact actctatgca ctactcggcg ctgcccgggt cgcgggccac gggccacggg 1080
 ctagtcttcg gctcgtcggc tgtgcgagg gggtccact cggagaatct ctgtctttac 1140
 gatatgcacc ttcaccacga ccggggcccc atgtacgagg agctcaatgc gttttttcat 1200
 aactgagact tcgcgccgnc tccctncttt ttcttttgcc ttgcccgcc cccctgtccc 1260
 cagccccag agcgcaggga ccccccatc ctaccccggc gccgggcgcg gggagcgggc 1320
 caccggtcct gccgctctcc tggggcagcg cagtcctgtt acctgtgggt ggcctgtccc 1380
 aggggcctcg ctccccccag gggactcgcc ttctctcccc aagggttcc ctctctctt 1440
 ctcccaagga gtgtttctcc agggacctct ctccgggggc tccctggagg caccctccc 1500
 ccattcccaa tatcttcgct gaggtttcct cctccccctc ctccctgcag 1550

<210> 4

<211> 1635

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> gene

<222> (0)...(0)

<223> Achaete scute homologous protein (ASH1) gene;

Genbank accession L08424

<400> 4

cccagagacc ggcaagag agcgcagcct tagtaggaga ggaacgcgag acgcggcaga 60
 gcgcgttcag cactgacttt tgctgctgct tctgcttttt tttttcttag aaacaagaag 120
 gcgccagcgg cagcctcaca cgcgagcgcc acgcgaggct cccgaagcca acccgcaag 180
 ggaggagggg agggaggagg aggcggcgtg caggaggagg aaaaagcatt ttcaccttt 240

ttgctccac tctaagaagt ctcccgggga tttgtatat attttttaac ttccgtcagg 300
 gctcccgtt catatttctt tttctttccc tctctgttcc tgcaccaag ttctctctgt 360
 gtccccctcg cgggccccgc acctcgcgtc cggatcgtt ctgattccgc gactccttgg 420
 ccgccgtgc gcatggaaag ctctgccaag atggagagcg gcggcgccgg ccagcagccc 480
 cagccgcagc ccagcagcc ctctctgccg cccgcagcct gtttctttgc cacggccgca 540
 gccgcggcgg ccgcagccgc cgcagcggca gcgcagagcg cgcagcagca gcagcagcag 600
 cagcagcagc agcagcagca gcaggcgccg cagctgagac cggcggccga cggccagccc 660
 tcagggggcg gtcacaagtc agcgcccaag caagtcaagc gacagcgttc gtcttcgccc 720
 gaactgatgc gctgcaaagc ccggctcaac ttcagcggct ttggctacag cctgccgcag 780
 cagcagccgg ccgccgtggc gcgccgcaac gagcgcgagc gcaaccgcgt caagttggtc 840
 aacctgggct ttgccaccct tcgggagcac gtccccaacg gcgcggccaa caagaagatg 900
 agtaagggtg agacactgcg ctccggcggtc gagtacctcc gcgcgctgca gcagctgctg 960
 gacgagcatg acgcggtgag cgcgccttc caggcaggcg tctgtcgcc caccatctcc 1020
 cccaactact ccaacgactt gaactccatg gccggctcgc cggctctatc ctactcgtcg 1080
 gacgagggtt cttacgaccc gctcagcccc gaggagcagg agcttctcga cttaccaac 1140
 tggttctgag gggctcggcc tggtcaggcc ctggtgcgaa tggacttttg aagcagggtg 1200
 atgcacaaac ctgcattctt agtgctttct tgtcagtggc gttgggaggg ggagaaaagg 1260
 aaaagaaaaa aaaagaagaa gaagaagaaa agagaagaag aaaaaaacga aaacagtcaa 1320
 ccaaccccat cgccaactaa gcgaggcatg cctgagagac atggctttca gaaaacggga 1380
 agcgtcaga acagtatctt tgcactccaa tcattcacgg agatatgaag agcaactggg 1440
 acctgagtca atgcgcaaaa tgcagcttgt gtgcaaaagc agtgggctcc tggcagaagg 1500
 gagcagcaca cgcgttatag taactcccat cacctctaac acgcacagct gaaagttctt 1560
 gctcgggtcc cttcacctcc ccgcccttc ttagagtgc gttcttagcc ctctagaaac 1620
 gagttggtgt ctttc 1635

<210> 5

<211> 3138

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> gene

<222> (0)...(0)

<223> Zic 1 Protein gene; Genbank Acession D76435

<400> 5

```

cgggtgccat gcagctttct ctaatttgct ctcagttcct ggctatgaat tgctaaacta 60
tcagtctcgc gctcaccgcc cggctgagga ggtgaaagtt tctccccagg aagataaacc 120
gcaaaagaca tatattgtgc atgatttgcg ctttttcttt ggctttttct ttctttcttc 180
acccccccac ccactttttt tttttttttt ttcaaaaagc agagaggggaa aaacggagag 240
tgaaggagcg aggaggcgag cgtgagagaa aggagagaga gagaaaagaa agggcgaggg 300
gctagtggag gaaggaagga ggggcggctg cgcgaggcgg agagagggcg aagcagtcgc 360
ggcactggcg ctcacattcc tctatgctac aaatccagga ggaagttttt ttttaggggg 420
ctgagatgct ccatgccttt aaaagggcag ccttgacgcg cggccctctc ggcagagact 480
gagcggcgag aaagtgcgag ccgggcccgc agaatctgcc tggcgggcgc tggagcctgc 540
gttactcgcg gcccgagcc gtccggctac tttgcgtttg gcccggccag cgccgcgcgg 600
cgcgcgcgcg ccattgcctg caggctagga cttcgcgagg tgggtcgact caccctccct 660
cctctcttc ttctctctct tctctctct cttgttcctc ctctctctcc cgattttccc 720
tcctcggctg gcgagggtgg ggggggcggg ggaggccggg gctcgccccg agcagccacg 780
atgctcctgg acgccggccc ccagtaccca gcgatcggcg tgaccacctt tggcgcgtcc 840
cgccaccact ccgcgggcga cgtggccgaa cgagacgtgg gcctgggcat caaccogttc 900
gccgacggca tgggcgcctt caagctcaac ccagttcgc acgagctggc ttcggccggc 960
cagacagcct tcacgtcgca ggcgccaggc tacgcggtg ctgcggccct gggccatcac 1020
catcaccgg gccacgtcgg ctctattcc agcgcagcct tcaactccac gcgggacttt 1080
ctgttcgcga accgggggtt tggcgacgcg gcggcggcag ccagcgcaca gcacagcctc 1140
tttgctgcat cggccggggg cttcgggggc ccacacggcc acacggacgc cgcggggccac 1200
ctctcttcc ccgggcttca cgagcaggct gccggccacg cgtcgccctaa cgtggtcaac 1260
gggcagatga ggctcggctt ctcgggggac atgtaccgc gaccggagca gtacggccag 1320

```

gtgaccagcc cgcgttcgga gcactatgct gcgccgcagc tgcacggcta cgggcccattg 1380
aacgtgaaca tggccgcgca tcacggcgcc ggccgcttct tccgctacat gcgccaaccc 1440
atcaagcaag agctcatctg caagtggatc gagcccgagc agctggccaa ccccaaaaag 1500
tcgtgcaaca aaactttcag caccatgcac gagctagtta cgcacgtcac cgtggagcac 1560
gtaggtggcc cggagcagag taatcacatc tgcttctggg aggagtgtcc gcgcgagggc 1620
aagcccttca aagccaaata caaactgggt aaccacatcc gcgtgcacac gggcgagaag 1680
ccctttccct gccctttccc tggctgtggc aaggtcttcg cgcgctccga gaatttaaag 1740
atccacaaaa ggacgcacac aggggagaag cccttcaagt gcgagtttga gggctgtgac 1800
cggcgcttcg ctaacagcag cgaccgcaag aagcacatgc acgtgcacac gagcgacaag 1860
ccctatcttt gcaagatgtg cgacaagtcc tacacgcac cagttccgt gcgcaaacac 1920
atgaagggtc acgaatcctc ctgcagggc tcgcagcctt cgccggccgc cagctctggc 1980
tacgaatcct ccacgcctcc caccatcgtg tctccctcca cagacaacc gaccacaagc 2040
tccttatcgc cctcctcctc cgcagtcac cacacagccg gccacagtgc gctctcttcc 2100
aattttaacg aatgggtacgt ttaaaatcag aaacaaaaca tcgaacaaaa ccctatttaa 2160
gagacttgat cacacacgta tacacaacat tactgaaaga accctgcgaa tcaaaacaac 2220
ccccacacag accccgcaat cctcttttaa aaaatctgcc aatagacca ggacgagtaa 2280
gagaggaagc atcaaccttt taaaaatttc ctttcgcttt cattattttt ctttttttgg 2340
caaaggcttg gtaccaagg tgcggtaggg ggtcgagggg gaggaggcca cctgacaaa 2400
tgccgccaac cccgagggcc agtttcttgt cgaatttgta cgggctctct ggggcttcgg 2460
cttctttttt tctttgtttt cttgtaaata cagaattatt agcttaaaac tgtactgttg 2520
aattctgtaa atagttatat ctcggttgga gcgggtgggt gggattgttg cgttgtgttc 2580
tttgcatagg gggagggggg agggaccgga tggcgggggg gagggggagg gggaggggtg 2640
ggcgccgaa agccaactgt ttgtactgaa tggcaagaat gttctagtaa atgtgtacca 2700
aaatgtgaat tactttgtac gattacagtc tccacgtcga cctaaccxaa tattattggt 2760
attaatgtgc tttttttgta taaagtcaa acatttcgtc ccaaagtcta agtactttag 2820
tgcagtaaaa tgttgtttca tgtcctgtca agaattcgta tagtacgagc ctggatctgc 2880
gtgtcaaact gtccatttg tttatgtaaa gtgatattaa aaaagatata aactataact 2940
gtccgttact tttggcaaaa gatacaacca cataatgtat ataattccta gtttccatat 3000
ttatccgcat gtaaagggcc ggtttatcca tgttacagct ctccaatatt tatggctaga 3060

agaactcgta tgtacacttt agtttccaga actgtttggt aacctttcgt accttattaa 3120
agattcttaa atctcaaa 3138

<210> 6

<211> 2623

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> gene

<222> (0)...(0)

<223> Myelin transcription factor 1 (MyT1) gene Genbank

Accession M96980

<400> 6

cggaagagtt actacagtaa agatccttca agagctgaga agcgtgagat caagtgtcca 60
acaccaggct gtgatggcac tggccacggt accgggttgt accctcacca ccgcagcctt 120
tctggctgtc cccacaagga taggatcccc ccagagatct tagccatgca tgagaacgtg 180
ctgaagtgcc cactcctgg ctgcacaggc cagggtcacg tgaacagcaa ccgcaacacg 240
cacagaagtt tgtctgggtg tcccattgct gccgccgaaa aattagccaa atcccatgag 300
aagcagcagc cgcagacagg agatccttcc aagagtagct ccaattccga tcggatcctc 360
aggcccatgt gttcgtgaa gcagctcgag gtccctccat atgggagcta ccggcccaac 420
gtggcccccc gccacacca gggccaactt ggcaaggagc tggagaagtt ctccaaggtc 480
acctttgact acgcaagttt cgatgctcag gtttttgga aacgcatgct tgccccaaag 540
attcagacca gcgaaacctc acctaaagcc tttcaatcca aacctttccc aaaggcctct 600
tccccaggc acagcccctc cagtagttat gtgaggagca cttcatcctc ttctgcaggc 660
tttgactact cgcaggacgc cgaggctgca cacatggctg cactgccat cctgaacctc 720
tccacgcgct gctgggagat gcctgagaac ctacagcaga agccacagga cctccccagc 780
aagtctgtgg atatcgaggt agacgaaaat ggaaccctgg acttgagcat gcacaaacac 840

cgcaaacgag aaaatgcttt cccacgacgc agcagctgca gcagcagccc cgggtgtgaag 900
 tctcccagcg cctcccagcg ccacagcagc accagcgccc ccagcagctc catgacctct 960
 cccagtgcca gccaggcctc ccgccaggac gagtgggacc ggcccctgga ctacaccaag 1020
 cctagccgcc tgagagagga ggaacctgag gagtgcagagc cagcagccca ttcttttgct 1080
 tcttctgaag cagatgacca ggaagtgtcg gaagagaatt ttgaggagcg gaagtatccg 1140
 ggggaagtca ccttgaccaa ctttaagctg aagtttctct ccaaggacat aaagaaggag 1200
 ctgctcacct gtcccacccc tggctgtgac ggcagcggcc acatcacccg gaactacgcc 1260
 tcccaccgca gcctctctgg ttgccctctt gctgacaaga gcctcagaaa cctcatggct 1320
 acccactctg ctgacctgaa gtgccccacg cccggctgtg acggctcttg ccacatcaca 1380
 gggaactacg cttcacaccg gagcttgtcc ggctgccctc gtgcaaagaa aagtggagtc 1440
 aaggtggcac ccaccaagga cgacaaggag gaccccgagc tgatgaagtg cccagttcca 1500
 ggctgtgtgg ggctcgggtca catcagcggg aaatacgctt ctcacaggag cgcattccggc 1560
 tgcccactgg ccgcccgcag gcagaaggaa gggtccttca atggctcgtc attctcctgg 1620
 aagtccctga agaatagaaga cccgacctgc cccaccccgg gctgtgacgg ctctggccac 1680
 accattggga gtttcttcac ccaccggagt ttgtcaggct gtcccagagc aacctttgct 1740
 ggaaagaagg gaaaactgtc aggggatgag gtcctcagtc caaagttcaa gactagcgac 1800
 gtgttgagga atgatgagga gatcaagcag ctgaaccagg agatccgaga cctgaacgag 1860
 tccaactcgg agatggaggc tgccatgggtg cagctgcagt cccagatctc ctccatggag 1920
 aagaacctga agaacatcga ggaggagaac aagctcattg aggagcagaa tgaagccctg 1980
 tttctggagc tgtccggcct gagccaggcc ctcatccaaa gtctcgccaa tatccacctt 2040
 ccacacatgg agccaatatg cgaacagaat ttcgttcctt atgtgagcac cctcacccgac 2100
 atgtactcca accaggcccc ggagaacaag gacctcctgg agagcatcaa gcaggctgtg 2160
 aggggcatcc aggtctaggc cgtgtggtac ccagaagtgt cccagcccac cacaccgttt 2220
 acctccctcg ccctgccccg caccgtgggg atgcccaact cacagtgact tcccgtttgg 2280
 ggcccgggtgt ggcgcgggcg ggtttatcca aagggatggc tggaaattgg ccgctccac 2340
 gaggtccct ccaggcttgg ccgtgggtggc cctatctgtg tgcatagggg cactgaagaa 2400
 ttacaaagtg atttattttt gttttctgaa agaaatctga agagcagctc aaagtctcca 2460
 gtggaagctc atggacaagg ttctcaggga agttttggag ttgcaacca cagtattcct 2520
 ttgtctgtcg aggctgggag ggtagccgtg agcgtgggtg gtgggtggtg tgagtggcat 2580

cttggcctgg agtacacgcc tggggcagcg tgtctgtgct cag

2623

<210> 7

<211> 356

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (0)...(0)

<223> Neuro D1 protein; Genbank Accession D82347

<400> 7

Met Thr Lys Ser Tyr Ser Glu Ser Gly Leu Met Gly Glu Pro Gln Pro
 1 5 10 15
 Gln Gly Pro Pro Ser Trp Thr Asp Glu Cys Leu Ser Ser Gln Asp Glu
 20 25 30
 Glu His Glu Ala Asp Lys Lys Glu Asp Asp Leu Glu Ala Met Asn Ala
 35 40 45
 Glu Glu Asp Ser Leu Arg Asn Gly Gly Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu
 50 55 60
 Asp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Asp Asp Gln Lys
 65 70 75 80
 Pro Lys Arg Arg Gly Pro Lys Lys Lys Lys Met Thr Lys Ala Arg Leu
 85 90 95
 Glu Arg Phe Lys Leu Arg Arg Met Lys Ala Asn Ala Arg Glu Arg Asn
 100 105 110
 Arg Met His Gly Leu Asn Ala Ala Leu Asp Asn Leu Arg Lys Val Val
 115 120 125

Pro Cys Tyr Ser Lys Thr Gln Lys Leu Ser Lys Ile Glu Thr Leu Arg
130 135 140
Leu Ala Lys Asn Tyr Ile Trp Ala Leu Ser Glu Ile Leu Arg Ser Gly
145 150 155 160
Lys Ser Pro Asp Leu Val Ser Phe Val Gln Thr Leu Cys Lys Gly Leu
165 170 175
Ser Gln Pro Thr Thr Asn Leu Val Gly Gly Cys Leu Gln Leu Asn Pro
180 185 190
Arg Thr Phe Leu Pro Glu Gln Asn Gln Asp Met Pro Pro His Leu Pro
195 200 205
Thr Ala Ser Ala Ser Phe Pro Val His Pro Tyr Ser Tyr Gln Ser Pro
210 215 220
Gly Leu Pro Ser Pro Pro Tyr Gly Thr Met Asp Ser Ser His Val Phe
225 230 235 240
His Val Lys Pro Pro Pro His Ala Tyr Ser Ala Ala Leu Glu Pro Phe
245 250 255
Phe Glu Ser Pro Leu Thr Asp Cys Thr Ser Pro Ser Phe Asp Gly Pro
260 265 270
Leu Ser Pro Pro Leu Ser Ile Asn Gly Asn Phe Ser Phe Lys His Glu
275 280 285
Pro Ser Ala Glu Phe Glu Lys Asn Tyr Ala Phe Thr Met His Tyr Pro
290 295 300
Ala Ala Thr Leu Ala Gly Ala Gln Ser His Gly Ser Ile Phe Ser Gly
305 310 315 320
Thr Ala Ala Pro Arg Cys Glu Ile Pro Ile Asp Asn Ile Met Ser Phe
325 330 335
Asp Ser His Ser His His Glu Arg Val Met Ser Ala Gln Leu Asn Ala
340 345 350
Ile Phe His Asp

355

<210> 8

<211> 356

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (0)...(0)

<223> Neurogenic basic helix-loop-helix protein (Neurod
1); Genbank Accession U50822.

<400> 8

Met	Thr	Lys	Ser	Tyr	Ser	Glu	Ser	Gly	Leu	Met	Gly	Glu	Pro	Gln	Pro
1				5					10					15	
Gln	Gly	Pro	Pro	Ser	Trp	Thr	Asp	Glu	Cys	Leu	Ser	Ser	Gln	Asp	Glu
			20					25					30		
Glu	His	Glu	Ala	Asp	Lys	Lys	Glu	Asp	Asp	Leu	Glu	Ala	Met	Asn	Ala
			35					40					45		
Glu	Glu	Asp	Ser	Leu	Arg	Asn	Gly	Gly	Glu	Glu	Glu	Asp	Glu	Asp	Glu
			50				55						60		
Asp	Leu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	Asp	Asp	Gln	Lys
			65			70				75				80	
Pro	Lys	Arg	Arg	Gly	Pro	Lys	Lys	Lys	Lys	Met	Thr	Lys	Ala	Arg	Leu
			85						90					95	
Glu	Arg	Phe	Lys	Leu	Arg	Arg	Met	Lys	Ala	Asn	Ala	Arg	Glu	Arg	Asn
			100					105						110	
Arg	Met	His	Gly	Leu	Asn	Ala	Ala	Leu	Asp	Asn	Leu	Arg	Lys	Val	Val

115 120 125
 Pro Cys Tyr Ser Lys Thr Gln Lys Leu Ser Lys Ile Glu Thr Leu Arg
 130 135 140
 Leu Ala Lys Asn Tyr Ile Trp Ala Leu Ser Glu Ile Ser Arg Ser Gly
 145 150 155 160
 Lys Ser Pro Asp Leu Val Ser Phe Val Gln Thr Leu Cys Lys Gly Leu
 165 170 175
 Ser Gln Pro Thr Thr Asn Leu Val Ala Gly Cys Leu Gln Leu Asn Pro
 180 185 190
 Arg Thr Phe Leu Pro Glu Gln Asn Gln Asp Met Pro Pro His Leu Pro
 195 200 205
 Thr Ala Ser Ala Ser Phe Pro Val His Pro Tyr Ser Tyr Gln Ser Pro
 210 215 220
 Gly Leu Pro Ser Pro Pro Tyr Gly Thr Met Asp Ser Ser His Val Phe
 225 230 235 240
 His Val Lys Pro Pro Pro His Ala Tyr Ser Ala Ala Leu Glu Pro Phe
 245 250 255
 Phe Glu Ser Pro Leu Thr Asp Cys Thr Ser Pro Ser Phe Asp Gly Pro
 260 265 270
 Leu Ser Pro Pro Leu Ser Ile Asn Gly Asn Phe Ser Phe Lys His Glu
 275 280 285
 Pro Ser Ala Glu Phe Glu Lys Asn Tyr Ala Phe Thr Met His Tyr Pro
 290 295 300
 Ala Ala Thr Leu Ala Gly Ala Gln Ser His Gly Ser Ile Phe Ser Gly
 305 310 315 320
 Thr Ala Ala Pro Arg Cys Glu Ile Pro Ile Asp Asn Ile Met Ser Phe
 325 330 335
 Asp Ser His Ser His His Glu Arg Val Met Ser Ala Gln Leu Asn Ala
 340 345 350

Ile Phe His Asp

355

<210> 9

<211> 382

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (0)...(0)

<223> Neurogenic basic helix-loop-helix protein (neuro
D2); Genbank Accession U58681.

<400> 9

Met	Leu	Thr	Arg	Leu	Phe	Ser	Glu	Pro	Gly	Leu	Leu	Ser	Asp	Val	Pro
1				5					10					15	
Lys	Phe	Ala	Ser	Trp	Gly	Asp	Gly	Glu	Asp	Asp	Glu	Pro	Arg	Ser	Asp
				20				25						30	
Lys	Gly	Asp	Ala	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Ala	Pro	Gly	Pro	Gly	Ala
				35				40						45	
Pro	Gly	Pro	Ala	Arg	Ala	Ala	Lys	Pro	Val	Pro	Leu	Arg	Gly	Glu	Glu
				50				55						60	
Gly	Thr	Glu	Ala	Thr	Leu	Ala	Glu	Val	Lys	Glu	Glu	Gly	Glu	Leu	Gly
				65				70						75	
Gly	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Leu	Asp	Glu
				85										90	
Glu	Gly	Glu	Arg	Pro	Lys	Lys	Arg	Gly	Pro	Lys	Lys	Arg	Lys	Met	Thr
				100										110	

Lys Ala Arg Leu Glu Arg Ser Lys Leu Arg Arg Gln Lys Ala Asn Ala
 115 120 125
 Arg Glu Arg Asn Arg Met His Asp Leu Asn Ala Ala Leu Asp Asn Leu
 130 135 140
 Arg Lys Val Val Pro Cys Tyr Ser Lys Thr Gln Lys Leu Ser Lys Ile
 145 150 155 160
 Glu Thr Leu Arg Leu Ala Lys Asn Tyr Ile Trp Ala Leu Ser Glu Ile
 165 170 175
 Leu Arg Ser Gly Lys Arg Pro Asp Leu Val Ser Tyr Val Gln Thr Leu
 180 185 190
 Cys Lys Gly Leu Ser Gln Pro Thr Thr Asn Leu Val Ala Gly Cys Leu
 195 200 205
 Gln Leu Asn Ser Arg Asn Phe Leu Thr Glu Gln Gly Ala Asp Gly Ala
 210 215 220
 Gly Arg Phe His Gly Ser Gly Gly Pro Phe Ala Met His Pro Tyr Pro
 225 230 235 240
 Tyr Pro Cys Ser Arg Leu Ala Gly Ala Gln Cys Gln Ala Ala Gly Gly
 245 250 255
 Leu Gly Gly Gly Ala Ala His Ala Leu Arg Thr His Gly Tyr Cys Ala
 260 265 270
 Ala Tyr Glu Thr Leu Tyr Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Ala Ser Pro
 275 280 285
 Asp Tyr Asn Ser Ser Glu Tyr Glu Gly Pro Leu Ser Pro Pro Leu Cys
 290 295 300
 Leu Asn Gly Asn Phe Ser Leu Lys Gln Asp Ser Ser Pro Asp His Glu
 305 310 315 320
 Lys Ser Tyr His Tyr Ser Met His Tyr Ser Ala Leu Pro Gly Ser Arg
 325 330 335
 Pro Thr Gly His Gly Leu Val Phe Gly Ser Ser Ala Val Arg Gly Gly

340 345 350
Val His Ser Glu Asn Leu Leu Ser Tyr Asp Met His Leu His His Asp
355 360 365
Arg Gly Pro Met Tyr Glu Glu Leu Asn Ala Phe Phe His Asn
370 375 380

<210> 10

<211> 238

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (0)...(0)

<223> Achaete scute homologous protein (ASH1); Genbank
Accession L08424.

<400> 10

Met Glu Ser Ser Ala Lys Met Glu Ser Gly Gly Ala Gly Gln Gln Pro
1 5 10 15
Gln Pro Gln Pro Gln Gln Pro Phe Leu Pro Pro Ala Ala Cys Phe Phe
20 25 30
Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gln
35 40 45
Ser Ala Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
50 55 60
Ala Pro Gln Leu Arg Pro Ala Ala Asp Gly Gln Pro Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80
His Lys Ser Ala Pro Lys Gln Val Lys Arg Gln Arg Ser Ser Ser Pro

	85	90	95
Glu Leu Met Arg Cys Lys Arg Arg Leu Asn Phe Ser Gly Phe Gly Tyr			
100	105	110	
Ser Leu Pro Gln Gln Gln Pro Ala Ala Val Ala Arg Arg Asn Glu Arg			
115	120	125	
Glu Arg Asn Arg Val Lys Leu Val Asn Leu Gly Phe Ala Thr Leu Arg			
130	135	140	
Glu His Val Pro Asn Gly Ala Ala Asn Lys Lys Met Ser Lys Val Glu			
145	150	155	160
Thr Leu Arg Ser Ala Val Glu Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Gln Leu Leu			
165	170	175	
Asp Glu His Asp Ala Val Ser Ala Ala Phe Gln Ala Gly Val Leu Ser			
180	185	190	
Pro Thr Ile Ser Pro Asn Tyr Ser Asn Asp Leu Asn Ser Met Ala Gly			
195	200	205	
Ser Pro Val Ser Ser Tyr Ser Ser Asp Glu Gly Ser Tyr Asp Pro Leu			
210	215	220	
Ser Pro Glu Glu Gln Glu Leu Leu Asp Phe Thr Asn Trp Phe			
225	230	235	

<210> 11

<211> 447

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (0)...(0)

<223> Zic 1 protein; Genbank Accession D76435.

<400> 11

Met Leu Leu Asp Ala Gly Pro Gln Tyr Pro Ala Ile Gly Val Thr Thr
 1 5 10 15
 Phe Gly Ala Ser Arg His His Ser Ala Gly Asp Val Ala Glu Arg Asp
 20 25 30
 Val Gly Leu Gly Ile Asn Pro Phe Ala Asp Gly Met Gly Ala Phe Lys
 35 40 45
 Leu Asn Pro Ser Ser His Glu Leu Ala Ser Ala Gly Gln Thr Ala Phe
 50 55 60
 Thr Ser Gln Ala Pro Gly Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Leu Gly His His
 65 70 75 80
 His His Pro Gly His Val Gly Ser Tyr Ser Ser Ala Ala Phe Asn Ser
 85 90 95
 Thr Arg Asp Phe Leu Phe Arg Asn Arg Gly Phe Gly Asp Ala Ala Ala
 100 105 110
 Ala Ala Ser Ala Gln His Ser Leu Phe Ala Ala Ser Ala Gly Gly Phe
 115 120 125
 Gly Gly Pro His Gly His Thr Asp Ala Ala Gly His Leu Leu Phe Pro
 130 135 140
 Gly Leu His Glu Gln Ala Ala Gly His Ala Ser Pro Asn Val Val Asn
 145 150 155 160
 Gly Gln Met Arg Leu Gly Phe Ser Gly Asp Met Tyr Pro Arg Pro Glu
 165 170 175
 Gln Tyr Gly Gln Val Thr Ser Pro Arg Ser Glu His Tyr Ala Ala Pro
 180 185 190
 Gln Leu His Gly Tyr Gly Pro Met Asn Val Asn Met Ala Ala His His
 195 200 205
 Gly Ala Gly Ala Phe Phe Arg Tyr Met Arg Gln Pro Ile Lys Gln Glu

210	215	220	
Leu Ile Cys Lys Trp Ile Glu Pro Glu Gln Leu Ala Asn Pro Lys Lys			
225	230	235	240
Ser Cys Asn Lys Thr Phe Ser Thr Met His Glu Leu Val Thr His Val			
245	250	255	
Thr Val Glu His Val Gly Gly Pro Glu Gln Ser Asn His Ile Cys Phe			
260	265	270	
Trp Glu Glu Cys Pro Arg Glu Gly Lys Pro Phe Lys Ala Lys Tyr Lys			
275	280	285	
Leu Val Asn His Ile Arg Val His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Pro Cys			
290	295	300	
Pro Phe Pro Gly Cys Gly Lys Val Phe Ala Arg Ser Glu Asn Leu Lys			
305	310	315	320
Ile His Lys Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Lys Cys Glu Phe			
325	330	335	
Glu Gly Cys Asp Arg Arg Phe Ala Asn Ser Ser Asp Arg Lys Lys His			
340	345	350	
Met His Val His Thr Ser Asp Lys Pro Tyr Leu Cys Lys Met Cys Asp			
355	360	365	
Lys Ser Tyr Thr His Pro Ser Ser Val Arg Lys His Met Lys Val His			
370	375	380	
Glu Ser Ser Ser Gln Gly Ser Gln Pro Ser Pro Ala Ala Ser Ser Gly			
385	390	395	400
Tyr Glu Ser Ser Thr Pro Pro Thr Ile Val Ser Pro Ser Thr Asp Asn			
405	410	415	
Pro Thr Thr Ser Ser Leu Ser Pro Ser Ser Ser Ala Val His His Thr			
420	425	430	
Ala Gly His Ser Ala Leu Ser Ser Asn Phe Asn Glu Trp Tyr Val			
435	440	445	

<210> 12

<211> 725

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PEPTIDE

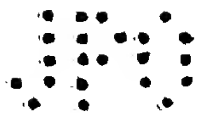
<222> (0)...(0)

<223> Myelin transcription factor 1 (My T1); Genbank

Accession M96980.

<400> 12

Arg Lys Ser Tyr Tyr Ser Lys Asp Pro Ser Arg Ala Glu Lys Arg Glu
 1 5 10 15
 Ile Lys Cys Pro Thr Pro Gly Cys Asp Gly Thr Gly His Val Thr Gly
 20 25 30
 Leu Tyr Pro His His Arg Ser Leu Ser Gly Cys Pro His Lys Asp Arg
 35 40 45
 Ile Pro Pro Glu Ile Leu Ala Met His Glu Asn Val Leu Lys Cys Pro
 50 55 60
 Thr Pro Gly Cys Thr Gly Gln Gly His Val Asn Ser Asn Arg Asn Thr
 65 70 75 80
 His Arg Ser Leu Ser Gly Cys Pro Ile Ala Ala Ala Glu Lys Leu Ala
 85 90 95
 Lys Ser His Glu Lys Gln Gln Pro Gln Thr Gly Asp Pro Ser Lys Ser
 100 105 110
 Ser Ser Asn Ser Asp Arg Ile Leu Arg Pro Met Cys Phe Val Lys Gln
 115 120 125



特 2 0 0 0 — 0 4 8 2 9 1

Leu Glu Val Pro Pro Tyr Gly Ser Tyr Arg Pro Asn Val Ala Pro Arg
130 135 140
His Thr Gln Gly Gln Leu Gly Lys Glu Leu Glu Lys Phe Ser Lys Val
145 150 155 160
Thr Phe Asp Tyr Ala Ser Phe Asp Ala Gln Val Phe Gly Lys Arg Met
165 170 175
Leu Ala Pro Lys Ile Gln Thr Ser Glu Thr Ser Pro Lys Ala Phe Gln
180 185 190
Ser Lys Pro Phe Pro Lys Ala Ser Ser Pro Arg His Ser Pro Ser Ser
195 200 205
Ser Tyr Val Arg Ser Thr Ser Ser Ser Ser Ala Gly Phe Asp Tyr Ser
210 215 220
Gln Asp Ala Glu Ala Ala His Met Ala Ala Thr Ala Ile Leu Asn Leu
225 230 235 240
Ser Thr Arg Cys Trp Glu Met Pro Glu Asn Leu Ser Thr Lys Pro Gln
245 250 255
Asp Leu Pro Ser Lys Ser Val Asp Ile Glu Val Asp Glu Asn Gly Thr
260 265 270
Leu Asp Leu Ser Met His Lys His Arg Lys Arg Glu Asn Ala Phe Pro
275 280 285
Ser Ser Ser Ser Cys Ser Ser Ser Pro Gly Val Lys Ser Pro Asp Ala
290 295 300
Ser Gln Arg His Ser Ser Thr Ser Ala Pro Ser Ser Ser Met Thr Ser
305 310 315 320
Pro Gln Ser Ser Gln Ala Ser Arg Gln Asp Glu Trp Asp Arg Pro Leu
325 330 335
Asp Tyr Thr Lys Pro Ser Arg Leu Arg Glu Glu Glu Pro Glu Glu Ser
340 345 350
Glu Pro Ala Ala His Ser Phe Ala Ser Ser Glu Ala Asp Asp Gln Glu

355 360 365
 Val Ser Glu Glu Asn Phe Glu Glu Arg Lys Tyr Pro Gly Glu Val Thr
 370 375 380
 Leu Thr Asn Phe Lys Leu Lys Phe Leu Ser Lys Asp Ile Lys Lys Glu
 385 390 395 400
 Leu Leu Thr Cys Pro Thr Pro Gly Cys Asp Gly Ser Gly His Ile Thr
 405 410 415
 Gly Asn Tyr Ala Ser His Arg Ser Leu Ser Gly Cys Pro Leu Ala Asp
 420 425 430
 Lys Ser Leu Arg Asn Leu Met Ala Thr His Ser Ala Asp Leu Lys Cys
 435 440 445
 Pro Thr Pro Gly Cys Asp Gly Ser Gly His Ile Thr Gly Asn Tyr Ala
 450 455 460
 Ser His Arg Ser Leu Ser Gly Cys Pro Arg Ala Lys Lys Ser Gly Val
 465 470 475 480
 Lys Val Ala Pro Thr Lys Asp Asp Lys Glu Asp Pro Glu Leu Met Lys
 485 490 495
 Cys Pro Val Pro Gly Cys Val Gly Leu Gly His Ile Ser Gly Lys Tyr
 500 505 510
 Ala Ser His Arg Ser Ala Ser Gly Cys Pro Leu Ala Ala Arg Arg Gln
 515 520 525
 Lys Glu Gly Ser Leu Asn Gly Ser Ser Phe Ser Trp Lys Ser Leu Lys
 530 535 540
 Asn Glu Asp Pro Thr Cys Pro Thr Pro Gly Cys Asp Gly Ser Gly His
 545 550 555 560
 Thr Ile Gly Ser Phe Leu Thr His Arg Ser Leu Ser Gly Cys Pro Arg
 565 570 575
 Ala Thr Phe Ala Gly Lys Lys Gly Lys Leu Ser Gly Asp Glu Val Leu
 580 585 590

Ser Pro Lys Phe Lys Thr Ser Asp Val Leu Glu Asn Asp Glu Glu Ile
595 600 605
Lys Gln Leu Asn Gln Glu Ile Arg Asp Leu Asn Glu Ser Asn Ser Glu
610 615 620
Met Glu Ala Ala Met Val Gln Leu Gln Ser Gln Ile Ser Ser Met Glu
625 630 635 640
Lys Asn Leu Lys Asn Ile Glu Glu Glu Asn Lys Leu Ile Glu Glu Gln
645 650 655
Asn Glu Ala Leu Phe Leu Glu Leu Ser Gly Leu Ser Gln Ala Leu Ile
660 665 670
Gln Ser Leu Ala Asn Ile His Leu Pro His Met Glu Pro Ile Cys Glu
675 680 685
Gln Asn Phe Val Pro Tyr Val Ser Thr Leu Thr Asp Met Tyr Ser Asn
690 695 700
Gln Ala Pro Glu Asn Lys Asp Leu Leu Glu Ser Ile Lys Gln Ala Val
705 710 715 720
Arg Gly Ile Gln Val
725

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

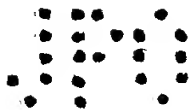
<213> Homo sapiens

<220>

<221> gene

<222> (0)...(0)

<223> MSX1 antisense oligonucleotide sequence MSX1-1



特 2 0 0 0 - 0 4 8 2 9 1

<400> 13

gacaccgagt ggcaaagaag tcatgtc

27

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> gene

<222> (0)...(0)

<223> MSX1 antisense oligonucleotide sequence MSX1-2

<400> 14

cggcttcctg tggtcggcca tgag

24

<210> 15

<211> 35

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> gene

<222> (0)...(0)

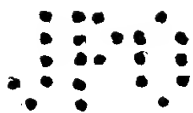
<223> HES1 open reading frame 5' sequence (HES1-1)

<400> 15

accggggacg aggaattttt ctccattata tcagc

35

<210> 16



<211> 40

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> gene

<222> (0)...(0)

<223> HES1 open reading frame middle sequence (HES1-2)

<400> 16

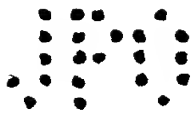
cacggaggtg cgcctgttgc tgggctggtg tgggttagac

40

【図面の簡単な説明】

【図 1】

ニューロン細胞への表皮基底細胞の分化転換。脱分化した表皮基底細胞は、N e u r o D 1 + Z i c 1 + M y T 1 でトランスフェクションし、同時に M S X 1 と H E S 転写因子の一部に対応するアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理した。(A) 表皮基底細胞、(B) 脱分化した表皮基底細胞、(C) 新しく創り出したニューロン、細胞の 2 5 % は、トランスフェクションおよび B D N F と全 - t r a n s レチノイン酸による処理の 5 日後の免疫反応性のニューロフィラメント M である。



特 2 0 0 0 - 0 4 8 2 9 1

【書類名】 図面

【図 1】

(A)

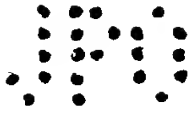


(B)



(C)

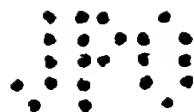




【書類名】 要約書

【要約】 表皮基底細胞を、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の、1つまたはそれ以上の形態学的、生理学および／または免疫学的特徴を有する細胞に、分化転換する方法であって、哺乳動物被験体の皮膚に由来する1つまたはそれ以上の表皮基底細胞を含む増殖表皮基底細胞集団を培養すること；NeuroD1 (NeuroD1)、NeuroD2 (NeuroD2)、ASH1、Zic1、Zic3、およびMyT1よりなる群からの、ヒト神経原性転写因子または相同的な非ヒト神経原性転写因子、またはその活性な断片をコードする少なくとも1つのcDNAを含有する1つまたはそれ以上の真核生物発現ベクターにより、該表皮基底細胞をインビトロでトランスフェクションすることにより、該細胞中で少なくとも1つの神経原性転写因子が発現されるようにすること；ヒトMSX1遺伝子および／またはヒトHES1遺伝子の1つのセグメント、またはこれらのいずれかの相同的な非ヒト対応物を含んでなる、少なくとも1つのアンチセンスオリゴヌクレオチドの存在下で、トランスフェクションした細胞を増殖させ、こうしてニューロン分化の少なくとも1つの負の調節因子を抑制すること；および、場合によりレチノイド、およびBDNF、CNTF、PDGF、NGF、NT-3、NT-4、ソニックヘッジホッグ (sonic hedgehog)、またはIL-6を含むサイトカインと一緒に該細胞を増殖させることを含んでなる方法が開示される。また、表皮起源の分化転換した細胞およびこれに由来する細胞培養物が開示される。さらに、分化転換した細胞の形態学的、生理学および／または分子生物学的性質に、インビトロで及ぼす作用の存在または非存在を検出することにより、新規な神経成長因子を同定するため、または可能性ある化学療法剤をスクリーニングするための、本発明の分化転換した細胞および細胞培養物の使用方法が記載され、同様に、遺伝子起源の神経系障害を治療するための可能性ある化学療法剤をスクリーニングするための分化転換した細胞および細胞培養物の使用方法が記載される。本方法を実施するために有用なキットが開示される。

【選択図】 なし



特 2000-048291

出願番号特定通知書

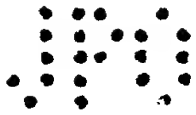
平成12年 3月27日
特許庁長官

特許提出者代理人 浅村 皓

様

平成12年 2月15日付け提出の優先権証明書提出書（事件の表示の欄 出願日平成12年 1月20日・整理番号PA-24323）については、出願番号を特願2000-048291と特定したので通知します。

課長	上席主任方式審査専門官	主任方式審査専門官	方式審査専門官
	第八担当		
	0097		



特 2 0 0 0 - 0 4 8 2 9 1

要 約 不 備 修 正 デ ー タ

所 属 特 許 情 報 管 理 課

【中間コード】

9 7 2 - 0 0 1

【出願番号】

特 願 平 1 2 - 0 4 8 2 9 1

【審査官コード】

7 6 2 9

【作成日】

平 成 1 2 年 0 7 月 2 6 日

【採用した要約書】 1

- 1、出願時のものを修正
- 2、新規に作成したもの
- 3、下記日付けの手續補正書に添付のもの

上記 3、の場合 平 成 年 月 日 の手續補正書

【要約書とともに
公開される図面】

【 】 図

※選択図のみの修正はイメージ入力なし。

【特許】 平12-048291 (12.03.21)

文字数 : 903

【書類名】 特 要約書

【要約】

表皮基底細胞を、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の、1つまたはそれ以上の形態学的、生理学および/または免疫学的特徴を有する細胞に、分化転換する方法であって、哺乳動物被験体の皮膚に由来する1つまたはそれ以上の表皮基底細胞を含む増殖表皮基底細胞集団を培養すること; ~~Neuro-D1 (NeuroD1)、NeuroD2 (NeuroD2)、ASH1、Zic1、Zic3、およびMyT1~~よりなる群からの、ヒト神経原性転写因子または相同的な非ヒト神経原性転写因子、またはその活性な断片をコードする少なくとも1つのcDNAを含有する1つまたはそれ以上の真核生物発現ベクターにより、該表皮基底細胞をインビトロでトランスフェクションすることにより、該細胞中で少なくとも1つの神経原性転写因子が発現されるようにすること; ヒトMSX1遺伝子および/またはヒトHES1遺伝子の1つのセグメント、またはこれらのいずれかの相同的な非ヒト対応物を含んでなる、少なくとも1つのアンチセンスオリゴヌクレオチドの存在下で、トランスフェクションした細胞を増殖させ、こうしてニューロン分化の少なくとも1つの負の調節因子を抑制すること; および、場合によりレチノイド、およびBDNF、CNTF、PDGF、NGF、NT-3、NT-4、ソニックヘッジホッグ (sonic hedgehog)、またはIL-6を含むサイトカインと一緒に該細胞を増殖させることを含んでなる方法が開示される。また、表皮起源の分化転換した細胞およびこれに由来する細胞培養物が開示される。さらに、分化転換した細胞の形態学的、生理学および/または分

【特許】 平12-048291 (12.03.21)

頁 : 2/2

子生物学的性質に、インビトロで及ぼす作用の存在または非存在を検出することにより、新規な神経成長因子を同定するため、または可能性ある化学療法剤をスクリーニングするための、本発明の分化転換した細胞および細胞培養物の使用方法が記載され、同様に、遺伝子起源の神経系障害を治療するための可能性ある化学療法剤をスクリーニングするための分化転換した細胞および細胞培養物の使用方法が記載される。本方法を実施するために有用なキットが開示される。

【選択図】 なし

30

35

【課題】

神経前駆細胞、ニューロン細胞、神経膠細胞に関連する特徴を有する培養細胞系を提供する。胎児性供給源を必要としない。

【解決手段】

NeuroD1、NeuroD2、ASH1、Zic1、Zic3およびMyT1などよりなる神経原性転写因子、その相同的cDNA断片を含むベクターでトランスフェクションした表皮基底細胞を、ヒトMSX1遺伝子、ヒトヘS1遺伝子のセグメントを含んでなるアンチセンスオリゴヌクレオチドの存在下、場合によりニューロトロフィンやサイトカイン類の共存下に培養して分化誘導する。

神経系関連障害の原因究明、遺伝子治療や細胞治療、化学療法剤の開発の為にスクリーニング系に利用すること。

【選択図】 なし